

Einfluss von Mikrobiota auf Faktoren der intestinalen mukosalen Barriere

Dissertation

der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Eberhard Karls Universität Tübingen
zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)

vorgelegt von
Svetlana Becker
aus Tartu, Estland

Tübingen

2014

Tag der mündlichen Qualifikation:

16.10.2014

Dekan:

Prof. Dr. Wolfgang Rosenstiel

1. Berichterstatter:

Prof. Dr. Eduard F. Stange

2. Berichterstatter:

Prof. Dr. Andreas Peschel

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	3
Abkürzungen	5
1. Einleitung	7
1.1 Der Gastrointestinaltrakt	7
1.2 Intestinale Mikrobiota	8
1.3 Die mukosale Barriere	9
1.3.1 Das intestinale Epithel: Aufbau, Differenzierung und Funktion	10
1.3.1.1 Die Notch-Signalkaskade: frühe Determinierung des intestinalen Zellschicksals	11
1.3.2 Das angeborene Immunsystem	14
1.3.3 Mukus und Muzine: Aufbau und Funktion	18
1.4 Erkrankungen des Gastrointestinaltraktes	20
1.4.1 Chronisch entzündliche Darmerkrankungen	20
1.4.2 Intestinale Krebserkrankungen	24
1.4.3 Barrieredefekte bei Erkrankungen des Gastrointestinaltraktes	26
1.5 Zielsetzung	30
2. Material und Methoden	33
2.1 Material	33
2.1.1 Geräte	33
2.1.2 Verbrauchsmaterial	34
2.1.3 Chemikalien, Reagenzien, Blocker und andere Produkte	34
2.1.4 Molekularbiologische Kits	36
2.1.5 Puffer, Lösungen und Gele	36
2.1.6 Antikörper	39
2.1.7 Synthetische Oligonukleotide	40
2.1.8 Biologisches Material	40
2.1.8.1 Mausproben	40
2.1.8.2 Zellen	41
2.1.8.3 Bakterienstämme und ihre Charakteristika	42
2.2 Methoden	43
2.2.1 Aufzucht der Bakterien	43
2.2.2 Kultivierung der Zellen	44
2.2.3 Zellkulturexperimente	44
2.2.4 Inkubation der Zellen mit Bakterien	45
2.2.5 Behandlung der Zellen mit Blockern	45
2.2.6 Analyse der mRNA- Expression	47
2.2.7 Analyse der Proteinexpression	50
3. Ergebnisse	54
3.1 Der Einfluss intestinaler Bakterien auf die Expression der Differenzierungsfaktoren Hes1, Hath1 und KLF4	54
3.1.1 Effekt der einzelnen Bakterien auf die Expression von Hes1, Hath1 und KLF4 <i>in vitro</i>	54
3.1.2 Der Effekt der Mikrobiota in ihrer Gesamtheit auf die Expression von Hes1, Hath1 und KLF4 <i>in vivo</i>	59
3.2 Der Einfluss der intestinalen Bakterien auf die Expression der Muzine Muc1 und Muc2	61
3.2.1 Der Effekt der einzelnen Bakterien auf die Expression von Muc1 und Muc2 <i>in vitro</i>	61
3.2.2 Der Effekt der Mikrobiota in ihrer Gesamtheit auf die Expression von Muc1 und Muc2 <i>in vivo</i>	63

3.3 Der Effekt der Mikrobiota in ihrer Gesamtheit auf die Zahl der Becherzellen	64
3.4 Der Einfluss der intestinalen Bakterien auf die Expression der antimikrobiellen Peptide Elafin und HBD2	66
3.5 Die Rolle der Notch-Signalkaskade bei der <i>E. coli</i> Nissle-abhängigen Regulation von Hath1, KLF4, Muc1, Elafin und HBD2	68
3.6 Die Rolle von Flagellin bei der <i>E. coli</i> Nissle-abhängigen Regulation von Hes1, Hath1, Muc1, Elafin und HBD2	70
3.7 Die Rolle von TLR5 bei der <i>E. coli</i> Nissle-abhängigen Regulation von Hes1, Hath1 und Muc1, Elafin und HBD2	72
3.8 Die Rolle der NFkB-Signalkaskade bei der Regulation von Hes1, Hath1, KLF4, Muc1, Elafin und HBD2 <i>in vitro</i>	74
3.9 Die Rolle der NFkB-Signalkaskade bei der Regulation von Hes1, Math1, KLF4 und Muc1 <i>in vivo</i>	77
4. Diskussion	80
4.1 Der Einfluss von intestinalen Bakterien auf die Expression der Differenzierungsfaktoren Hes1, Hath1 und KLF4	81
4.2 Der Einfluss von intestinalen Bakterien auf die Expression der Muzine Muc1 und Muc2 und die Becherzellzahl	83
4.3 Der Einfluss von intestinalen Bakterien auf die Expression der antimikrobiellen Peptide Elafin und HBD2	86
4.4 Das Flagellin von <i>E. coli</i> Nissle ist über TLR5 in die Regulation von Hes1, Hath1, Muc1, Elafin und HBD2 involviert	87
4.5 Die Rolle der NFkB-Signalkaskade in der Regulation von Hes1, Hath1, KLF4, Muc1, Muc2, Elafin und HBD2	90
4.5.1 Die Rolle der NFkB-Signalkaskade in der Regulation von Hes1, Hath1 und KLF4	90
4.5.2 Die Rolle der NFkB-Signalkaskade in der Regulation von Muc1, Muc2, Elafin und HBD2	92
4.6 Schlussfolgerung und Ausblick	93
Literaturverzeichnis	97
Zusammenfassung	119

Abkürzungen

Abb.	Abbildung
AK	Antikörper
AP-1	<i>Activator protein 1</i>
bHLH	Basischer Helix-Loop-Helix
BMP	<i>Bone morphogenetic protein</i>
BSA	<i>Bovine serum albumine</i>
CAC	<i>Colitis associated cancer</i>
CED	Chronisch entzündliche Darmerkrankungen
CRC	<i>Colorectal cancer</i>
CSL	<i>CBF-1, Suppressor of Hairless und Lag-1</i>
CU	Colitis ulcerosa
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i>
EcN	<i>E. coli</i> Nissle 1917
EDTA	<i>Ethylenediaminetetraacetic acid</i>
Hath1	<i>Human atonal homolog 1</i>
HBD	humanes beta Defensin
HD	humanes alpha Defensin
Hes	<i>Hairy and enhancer of split</i>
HH	<i>Hedgehog</i>
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
IPAF	<i>Interleukin converting enzyme protease activating factor</i>
MAMP	<i>Microbe associated molecular pattern</i>
MAP	<i>Mitogen-activated protein</i>
Math	<i>Mouse atonal homolog</i>
MC	Morbus Crohn
MDP	Muramyl-Dipeptid
(m)RNA	<i>(Messenger) Ribonucleic acid</i>

MUC	Muzin
MyD88	<i>Myeloid differentiation primary response protein 88</i>
Naip	<i>NLR family, apoptosis inhibitory protein</i>
NEAS	Nichtessentielle Aminosäuren
NFkB	<i>Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B-cells</i>
NICD	<i>Notch intracellular domain</i>
NLR	NOD-like Rezeptor
NOD	<i>Nucleotide-binding oligomerization domain</i>
OD	Optische Dichte
PAMP	<i>Pathogen associated molecular pattern</i>
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i>
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i>
PRR	<i>Pattern recognition receptor</i>
rpm	<i>Rotation per minute</i>
SDS	Sodiumdodecylsulfate
SNP	<i>single nucleotide polymorphism</i>
STAT	<i>Signal transducers and activators of transcription</i>
Tab.	Tabelle
TGF	<i>Transforming growth factor</i>
TLR	Toll-like Rezeptor
TNF	<i>Tumor necrosis factor</i>
TRIS	Tris-(hydroxymethyl-)methylamin
TSB	<i>Tryptic Soy Broth</i>
VNTR	<i>Variable number of tandem repeats</i>
Wnt	Wingless/int-1
Wt	Wildtyp
X-Gal	5-Brom-4-chlor-indolyl- β -galactopyranosid

1. Einleitung

1.1 Der Gastrointestinaltrakt

Der Verdauungstrakt oder Gastrointestinaltrakt hat in erster Linie die Aufgabe, Nahrung aufzunehmen, zu spalten und daraus Nährstoffe, Elektrolyte und Wasser zu resorbieren. Dabei übernehmen die einzelnen Abschnitte des Gastrointestinaltraktes spezifische Funktionen des Verdauungsprozesses. Der obere Gastrointestinaltrakt mit Mundhöhle, Rachen, Speiseröhre, Magen und Zwölffingerdarm dient der Zerkleinerung und Aufspaltung der Nahrungsbestandteile. Im Jejunum und Ileum findet der Großteil der anschließenden Resorption statt. Die Hauptaufgabe des Dickdarms, der auch Kolon genannt wird und im Rektum endet, ist die Resorption von Wasser und restlichen Nährstoffen sowie die Stuhlentleerung. Die Wand des Gastrointestinaltraktes besteht in allen Abschnitten grundsätzlich aus vier Gewebeschichten: die äußerste Schicht ist der Bauchfellüberzug (*Tunica serosa*), gefolgt von der Muskelschicht (*Tunica muscularis*), der Unterschleimhaut (*Tunica submucosa*) und der Schleimhaut (*Tunica mucosa*). Die Schleimhaut oder Mukosa, welche die Innenwand des Gastrointestinaltraktes auskleidet, besteht aus einer Muskelschicht (*Lamina muscularis mucosae*), einer Bindegewebsschicht (*Lamina propria mucosae*) und wird vom Darmlumen mit einem einschichtigen Epithel (*Lamina epithelialis mucosae*) abgegrenzt.

Die Effizienz der Resorption wird durch eine Vergrößerung der Darmoberfläche erhöht. Dies erfolgt zum einen durch die Schleimhautfalten, auf welchen im Dünndarm zusätzlich etwa 1 mm hohe Ausstülpungen, sogenannte Villi, sitzen. Die größte Oberflächenvergrößerung kommt jedoch durch die Ausbildung von Mikrovilli zustande. Dabei handelt es sich um feine ausgestreckte Zellfortsätze auf der apikalen Oberfläche der absorptiven Epithelzellen. Außerdem ist die Schleimhaut von zahlreichen Einsenkungen, den so genannten Lieberkühn-Krypten übersät, welche im Dünndarm zwischen den Villi und im Dickdarm frei in das Lumen münden (Lüllmann-Rauch, 2009; Randall et al., 2002). Die Hauptaufgabe der Krypten ist die Regeneration des Epithels, wobei die Krypten des Dünndarms zusätzlich bei der Sekretion der antimikrobiellen Peptide zum Schutz vor dem Eindringen von Mikroorganismen eine große Rolle spielen (van der Flier and Clevers, 2009; Wehkamp et al., 2008).

1.2 Intestinale Mikrobiota

Bereits während der Geburt beginnt die Besiedlung des bis dahin völlig sterilen Gastrointestinaltraktes mit verschiedensten Mikroorganismen (Dominguez-Bello et al., 2010; Scholtens et al., 2012). Diese bauen ein komplexes Ökosystem aus Bakterien, Archaeen und Eukaryonten auf, wobei die Bakterien den größten Teil der intestinalen Gemeinschaft ausmachen (Xu and Gordon, 2003). In unserem Gastrointestinaltrakt leben etwa 10^{14} Bakterien von bis zu 1000 verschiedenen Spezies. Im Magen und Duodenum werden die meisten Mikroorganismen durch die Magensäure und Gallensäure abgetötet, wobei die Dichte etwa 10^1 bis 10^4 Bakterien pro ml Nahrungsbrei beträgt. Mit der Entfernung zum Magen steigt der pH-Wert und damit auch die Bakterienzahl auf 10^4 bis 10^8 pro ml Darminhalt im Jejunum und Ileum an. Der Dickdarm ist mit bis zu 10^{12} Keimen pro g Stuhl der am dichtesten besiedelte Abschnitt des menschlichen Gastrointestinaltraktes (Blaut and Clavel, 2007; Gerritsen et al., 2011). Dabei werden die verschiedenen Abschnitte des Gastrointestinaltraktes durch charakteristische Bakterien besiedelt. Die prominentesten des Dickdarms sind anaerobe Spezies wie *Bacteroides*, *Bifidobacteria*, *Fusobacteria*, *Clostridia* und *Peptostreptococci*, wogegen im Dünndarm eher aerobe und fakultativ aerobe Bakterien vorkommen wie *Enterobacteria*, *Streptococci* und *Lactobacilli* (Hayashi et al., 2005; Savage, 1977; Wang et al., 2005). Die Zusammensetzung der Darmmikrobiota wird durch viele Faktoren wie zum Beispiel die Ernährungsgewohnheiten, das Alter und Medikamenteneinnahme beeinflusst (Lagier et al., 2012). Auch die genetische Ausstattung des Wirtes scheint dabei eine Rolle zu spielen (Frank et al., 2011; Van de Merwe et al., 1983). Im Laufe der Evolution hat sich eine mutualistische, d.h. für beide Seiten vorteilhafte Beziehung zwischen Wirt und den kommensalen Darmmikroorganismen entwickelt (Ley et al., 2006). Die letzteren profitieren von einem Lebensraum mit günstigen Bedingungen, wie konstanter Temperatur und der ständigen Zufuhr von Nährstoffen. Aber auch der Wirt erhält zahlreiche „Dienstleistungen“ von seinen Untermietern. Man kann die intestinalen Mikrobiota sogar als ein multifunktionelles Organ ansehen, welches die Funktionen unseres Körpers vervollständigt (Xu and Gordon, 2003). Beispielsweise spalten die Darmmikroorganismen bestimmte unverdauliche Nahrungsbestandteile und machen sie damit ihrem Wirt verfügbar (Hooper et al., 2002). Außerdem degradieren bestimmte Darmkeime die mit der Nahrung aufgenommenen Schadstoffe wie Oxalate (Allison et al., 1986), synthetisieren Vitamine wie Vitamin B und K (Hill, 1997) und produzieren

gesundheitsfördernde Komponenten wie Butansäure (Louis and Flint, 2009). Verschiedene Studien mit keimfrei aufgezogenen Tieren haben gezeigt, wie wichtig die Anwesenheit und Zusammensetzung der Mikrobiota für die Entwicklung und Funktion des Darms sind. Zum Beispiel wird durch ihre Präsenz die Teilungsrate und Regeneration des Darmepithels erhöht (Gordon et al., 1997). Auch die Ausbildung der normalen Darmmorphologie sowie die Differenzierung und Funktion intestinaler Zellen aber auch die Entwicklung des intestinalen Immunsystems werden von den Darmmikroorganismen beeinflusst (Hooper and Gordon, 2001; Macpherson and Harris, 2004; Shirkey et al., 2006; Thompson and Trexler, 1971). Darüber hinaus schützen uns die kommensalen Darmbakterien vor der Besiedlung mit pathogenen Keimen wie Salmonellen (Paasché, 2013; Savage, 1977; Stecher and Hardt, 2008).

Neben den Vorteilen hat die Anwesenheit der intestinalen Keime aber auch eine Kehrseite. Es ist allgemein anerkannt, dass die kommensalen Darmbakterien bei der Entstehung einiger intestinaler Erkrankungen wie chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen (CED) und gastrointestinalen Krebs eine zentrale Rolle spielen (Darfeuille-Michaud et al., 2004; Marteau and Chaput, 2011; Sun, 2010). Die friedvolle Koexistenz von Wirt und Mikroorganismen ist im Normalfall durch eine multifaktorielle intestinale Barriere gewährleistet. Bei Defekten dieser schützenden Barriere können nicht nur pathogene, sondern auch kommensale Keime zur Auslösung einer intestinalen Erkrankung führen (Wehkamp et al., 2008).

1.3 Die mukosale Barriere

Trotz einer dichten mikrobiellen Besiedlung des Gastrointestinaltraktes treten Entzündungen äußerst selten auf. Im gesunden Gastrointestinaltrakt stellt eine aus mehreren Komponenten bestehende, fein regulierte intestinale Barriere einen effektiven Schutz gegen das Eindringen der Mikroorganismen dar (Wehkamp et al., 2008). Die intestinale Barriere besteht unter anderem aus der mechanischen Barriere der Darmmukosa und der darüber liegenden Mukusschicht, aber auch aus Komponenten des adaptiven und angeborenen Immunsystems, wie verschiedenen Immunzellen sowie diversen Effektormolekülen (Jäger et al., 2013; Liévin-Le Moal and Servin, 2006).

1.3.1 Das intestinale Epithel: Aufbau, Differenzierung und Funktion

Die Mukosa ist aus vier Hauptzelltypen aufgebaut, welche sich in absorptive und sekretorische Zelllinien aufteilen lassen. Zu den absorptiven Epithelzellen gehören die Enterozyten, welche 90% der Mukosa ausmachen. Ihre Aufgabe besteht hauptsächlich in der Aufnahme von verschiedenen Nahrungsbestandteilen und Wasser, aber auch in der Resorption von Gallensäuren sowie im Ionenaustausch. Zu den sekretorischen Zellen gehören die Becherzellen, welche den Mukus (Schleim) produzieren, die enteroendokrinen Zellen, welche die Sekretion von Hormonen wie Serotonin und Sekretin übernehmen, und die im Dünndarm vorkommenden Paneth'schen Körnerzellen, welche große Mengen an antimikrobiellen Peptiden sezernieren (Crosnier et al., 2006).

Das intestinale Epithel unterliegt zudem einer kontinuierlichen Regeneration und erneuert sich innerhalb von 4 bis 5 Tagen vollständig. Dabei besteht ein homöostatisches Gleichgewicht zwischen Zellproliferation und Apoptose (Cheng and Leblond, 1974; Sancho et al., 2003). Alle Zellen des Epithels stammen von Stammzellen ab, welche in einer Anzahl von 4-6 in den Kryptenbasen sitzen und sich alle 24 Stunden teilen. Dabei produzieren sie ständig Vorläuferzellen, die sich noch weitere 4- bis 5-mal teilen und währenddessen die Krypte aufwärts wandern. Während dieses Prozesses erfolgt eine Determinierung, bei der zuerst entschieden wird, ob die Vorläuferzellen einem sekretorischen oder absorptiven Schicksal folgen. Im weiteren Verlauf differenzieren sich die Vorläufer zu den einzelnen Zelltypen, um anschließend auf der Darmsurface im Kolon oder auf der Villusspitze im Dünndarm abzustarben und durch die nachfolgenden Zellen ersetzt zu werden (van der Flier and Clevers, 2009; Leedham et al., 2005). Dabei bilden die Paneth'schen Körnerzellen eine Ausnahme, da sie als Vorläufer an der Kryptenbasis bleiben und dort ausdifferenzieren (Bevins and Salzman, 2011).

Die Balance zwischen Proliferation, Differenzierung, Migration und Apoptose der intestinalen Epithelzellen wird durch ein fein abgestimmtes Netzwerk aus Regulationsmechanismen wie Wnt (aus Wg für *Wingless* und Int-1 für *integration 1*), Notch, BMP (*bone morphogenetic protein*) und HH (*hedgehog*) im Epithel der Krypte und dem umliegenden Mesenchymgewebe aufrechterhalten (Crosnier et al., 2006). Eine Dysregulation des regulatorischen Signalnetzwerkes kann zu Defekten in der epithelialen Differenzierung und Funktion und damit zur Schwächung der intestinalen Barriere und letztendlich zur Entstehung intestinaler Erkrankungen wie CED und Krebs führen

(Gersemann et al., 2009; Ochoa-Hernández et al., 2012; Reedijk et al., 2008; Wehkamp et al., 2007).

1.3.1.1 Die Notch-Signalkaskade: frühe Determinierung des intestinalen Zellschicksals

Für die Erhaltung der proliferativen Zone der Krypte ist die Notch-Signalkaskade im Zusammenspiel mit der Wnt-Signalkaskade essentiell (Crosnier et al., 2006). So hatte eine Inhibierung der Wnt-Signalkaskade in der Maus einen Verlust der proliferativen Krypten zur Folge sowie Anzeichen einer Entzündung und einer Degeneration der Darmarchitektur (Hoffman et al., 2004). Auch die Hemmung der Notch-Signalkaskade im Maudarm führte zur Verkleinerung der Kryptenregion (Jensen et al., 2000), wobei im Gegensatz ihre Überaktivierung in einer Vergrößerung des proliferativen Bereiches resultierte (Fre et al., 2005). Außer für die Homöostase der intestinalen Stammzellen sind die Wnt- und Notch-Signalwege auch für die Differenzierung bestimmter Zelltypen von großer Bedeutung. Die Wnt-Signalkaskade reguliert beispielsweise die Differenzierung und Reifung der Paneth'schen Körnerzellen im Dünndarm (Andreu et al., 2008; van Es et al., 2005). Die Notch-Signalkaskade spielt eine Schlüsselrolle bei der Entscheidung, ob eine Vorläuferzelle ein sekretorisches oder ein absorptives Schicksal einschlägt (van Den Brink et al., 2001; Fre et al., 2005).

Die Notch-Signalkaskade (Abb. 1) ist innerhalb des Tierreiches hochkonserviert und reguliert die Determinierung der Vorläuferzellen in verschiedenen Geweben sowohl während der Embryonalentwicklung als auch im adulten Organismus (Carlson and Conboy, 2007). Notch-Rezeptoren (Notch1 bis 4) sowie Notch-Liganden (Delta1, Delta3, Delta4, Jagged1 und Jagged2) sind Transmembranproteine und benötigen einen direkten Zell-Zell-Kontakt, um den Signalweg zu aktivieren. Solange die Notch-Signalkaskade nicht aktiv ist, binden Proteine der CSL-Familie (benannt als Kombination von CBF-1 im Menschen, Suppressor of Hairless in *Drosophila* und Lag-1 in *C. elegans*) zusammen mit einem Ko-Repressor-Komplex an die Enhancer-Region der Notch-Zielgene und verhindern deren Transkription. Bei einer kanonischen Aktivierung der Notch-Signalkaskade wird die intrazelluläre Notch-Domäne (NICD) nach einer Ligandenbindung durch die γ -Sekretase proteolytisch abgespalten und wandert in den Zellkern. NICD rekrutiert den Ko-Aktivatoren der Mastermind-Proteinfamilie (MAML) und interagiert mit dem CSL-Protein. Dadurch wird der Ko-Repressor-Komplex

verdrängt und ein NICD-CSL-MAML-Komplex gebildet, welcher die Aktivierung der Notch-Zielgene ermöglicht. Dazu gehören unter anderem auch die Hes-Gene (*Hairy and enhancer of split*), welche für transkriptionelle Repressoren kodieren (Chillakuri et al., 2012; Lai, 2004).

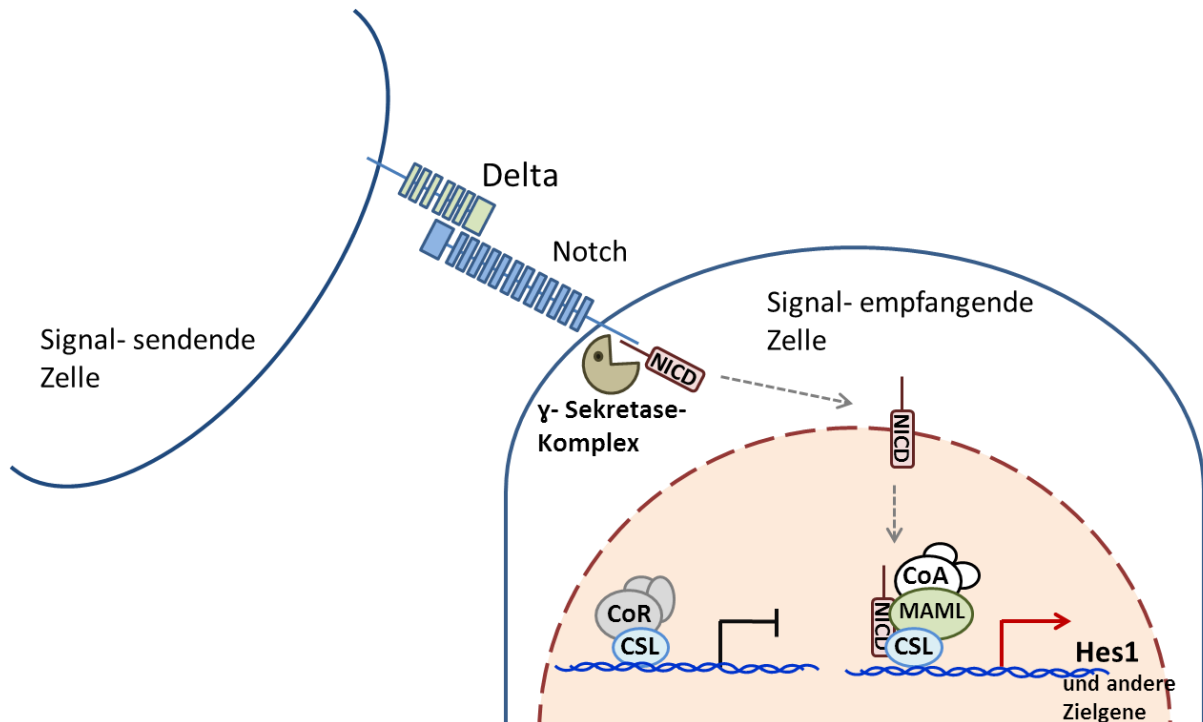


Abbildung 1: Schematische Darstellung der kanonischen Notch-Signalkaskade. CoR: Ko-Repressor-Komplex. CoA: Ko-Aktivator-Komplex.

Bei der epithelialen Determinierung spielen Hes1 und der Transkriptionsaktivator Hath1 (*human atonal homolog 1*) eine entscheidende Rolle. Van den Brink et al. generierten ein Modell, nach welchem die frühe Determinierung der sekretorischen und absorptiven Vorläuferzellen durch das antagonistische Zusammenspiel von Notch/Hes1 und Hath1 bestimmt wird (van Den Brink et al., 2001). Nach diesem Modell funktioniert die Determinierung der intestinalen Epithelzellen nach dem Prinzip der lateralen Inhibition (Collier et al., 1996). Aus einem noch nicht verstandenen Grund besitzen einige der Vorläuferzellen mehr Notch-Liganden und lösen in den Nachbarzellen, welche anfangs das gleiche Entwicklungspotenzial besitzen, eine stärkere Aktivierung der Notch-Kaskade aus. Verstärkt durch einen positiven Rückkopplungsmechanismus führt die Notch-Aktivität zur vermehrten Expression der Notch-Zielgene, darunter auch von Hes1, welches seinerseits die Expression von Hath1 hemmt. Durch dieses Ereignis wird die Determinierung zur absorptiven

Zelle eingeleitet. In der Nachbarzelle mit niedriger Notch-Aktivität und entsprechend niedriger Hes1-Expression kann Hath1 exprimiert werden. Dieser Vorläufer schlägt eine sekretorische Laufbahn ein (van Den Brink et al., 2001). Dieses Modell basiert auf Erkenntnissen, welche durch genetische Manipulationen in Mausversuchen gewonnen wurden, wie zum Beispiel durch Ausschalten oder Überaktivieren der Genexpression von Hes1 oder Math1 (Maus-Homolog zum humanen Hath1). Auch in den nachfolgenden Arbeiten konnte dieses Modell mehrmals bestätigt werden. So konnte man nach der Depletion des Math1-Gens im Maudarm beobachten, dass die absorptiven Enterozyten unverändert präsent waren, wobei alle drei Zelltypen der sekretorischen Zellen sowie die Expression der jeweils spezifischen sekretorischen Markern fehlten (Shroyer et al., 2007; Yang et al., 2001). Die Inhibition von Notch/Hes1 (beispielsweise mittels chemischer γ -Sekretase-Blockade) dagegen hatte eine erhöhte Anzahl von sekretorischen Zellen, gesteigerte Math1-Expression und eine verminderte Anzahl der Enterozyten zur Folge. Des Weiteren bewirkte die Notch-Überaktivierung eine Blockade der Math1-Expression und einen Rückgang aller sekretorischen Zelltypen (Fre et al., 2005; Jensen et al., 2000; Kim and Shivdasani, 2011; Milano et al., 2004; Okamoto et al., 2009; Suzuki et al., 2005). Auch in anderen Geweben, wie im Nervensystem, wird die Differenzierung zu verschiedenen Zelltypen durch das antagonistische Gegenspiel von Hes1 und Hath1 reguliert (Zheng et al., 2000).

Für die nachfolgende Differenzierung der prädeterminierten Vorläufer sind weitere molekulare Signale notwendig (van der Flier and Clevers, 2009). Für die vollständige Reifung der absorptiven Enterozyten sorgt die Expression der Faktoren Elf3 (*E47-like factor 3*) und Tgf- β RII (*transforming growth factor β type II receptor*) (Flentjar et al., 2007; Ng et al., 2002). Die Hath1-Vorläufer, welche an der Kryptbasis und damit unter dem Einfluss der Wnt-Signalgebung verbleiben, differenzieren zu Paneth'schen Körnerzellen (Andreu et al., 2008). Eine Hath1-Vorläuferzelle, welche Neurogenin3 (Ngn3) exprimiert, entwickelt sich zu einer enteroendokrinen Zelle, wobei weitere Faktoren die Spezifizierung der einzelnen Typen steuern (Jenny et al., 2002). Für die Reifung einer Becherzelle ist unter anderem der Transkriptionsfaktor KLF4 (*Krüppel-like factor 4*) wichtig (Katz et al., 2002).

1.3.2 Das angeborene Immunsystem

Das Immunsystem der höheren Lebewesen lässt sich in das angeborene und das adaptive Immunsystem aufteilen. Das angeborene Immunsystem, welches sich sehr früh in der Stammesgeschichte entwickelt hat und in allen Organismen konserviert ist, dient der Primärabwehr von Mikroorganismen in der ersten Phase der Infektion. Die Schutzreaktion ist dabei Antigen-unspezifisch und ermöglicht eine sehr schnelle Abwehr gegen ein breites Spektrum an Mikroorganismen. Bei Erreichen eines Schwellenwertes der Infektion wird das adaptive Immunsystem mobilisiert, welches auf einer Antigen-spezifischen Reaktion der T- und B-Lymphozyten basiert und gezielt gegen bestimmte Epitope der mikrobiellen Strukturen gerichtet ist (Janeway, 2009).

1.3.2.1 Die Erkennung der Mikroorganismen

Das angeborene Immunsystem erkennt Mikroorganismen anhand spezieller im Genom kodierter Rezeptoren, der PRRs (*pattern recognition receptors*), welche bestimmte hochkonservierte mikrobielle Bestandteile, PAMPs (*pathogen associated molecular patterns*) bzw. MAMPs (*microbe associated molecular patterns*) binden (Akira et al., 2006; Didierlaurent et al., 2002). Die PRRs kommen sowohl in den Immunzellen als auch in den Epithelzellen vor und können intrazellulär, wie NOD-like Rezeptoren, auch NLR genannt (NOD steht für „*nucleotide binding oligomerization domain*“), oder membranständig, wie die TLRs (*toll like receptors*) vorliegen. Die Familie der intrazellulären NLRs umfassen im Menschen bisher 22 identifizierte Mitglieder, wovon 6 zu der NOD-Subfamilie zählen: NOD1 bis 5 und CIITA (*class II transactivator*) (Kawai and Akira, 2010; Moreira and Zamboni, 2012). Die NODs sind sowohl in den Immunzellen als auch in anderen Zelltypen einschließlich der Epithelzellen zu finden und binden Peptidoglykane der bakteriellen Membran. NOD2 erkennt beispielsweise das Muramyl-dipeptid der Gram-positiven und der Gram-negativen Bakterien und reguliert unter anderem in Paneth'schen Körnerzellen die Produktion der antimikrobiellen Peptide (Lecat et al., 2010; Wehkamp et al., 2004a).

Im Menschen wurden bisher 10 funktionelle Mitglieder der TLRs entdeckt. Diese binden unter anderem Membranstrukturen von Gram-positiven Bakterien, wie Peptidoglykan (TLR2) und Gram-negativen Bakterien, wie Lipopolysaccharid (TLR4), aber auch Flagellin (TLR5), den Hauptbestandteil der bakteriellen Flagelle. Außerdem werden die bakteriellen und viralen

Nukleinsäuren (TLR3, 7, 8 und 9), Bestandteile von Pilzen, wie Manan aus *Candida albicans* (TLR2 und 4) aber auch körpereigene Proteine, wie Hitzeschockproteine (TLR4) erkannt (Akira et al., 2006). Je nach TLR können intrazellulär zwei Signalkaskaden entweder über das Adaptermolekül MyD88 (*Myeloid differentiation primary response protein 88*) oder TRIF (*TIR-domain-containing adapter-inducing interferon- β*) ausgelöst werden, welche wiederum über andere sich teilweise überschneidenden Signalmodule verschiedene Transkriptionsfaktoren, wie NF κ B (*nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B-cells*), AP-1 (*activator protein 1*), STATs (*signal transducers and activators of transcription*) aber auch MAP-Kinasen (*mitogen-activated protein kinases*) aktivieren (Kawai and Akira, 2010).

1.3.2.2 Die NF κ B-Signalkaskade

Die NF κ B-Signalkaskade (Abb. 2) ist neben der Immunantwort in Prozesse wie Proliferation, Differenzierung und Apoptose involviert (Guttridge et al., 1999; Kumar et al., 2004) und ist wesentlich an den Funktionen der intestinalen Barriere beteiligt (Lawrence, 2009; Schlee et al., 2007; Witthöft et al., 2005). Zu der NF κ B-Familie gehören fünf Transkriptionsfaktoren (RelA/p65, c-Rel, RelB, p50 und p52) welche als Homo- oder Heterodimere an ein spezifisches DNA-Motiv (kB-Motiv) binden. Im unstimulierten Zustand sind die NF κ B-Dimere im Zytoplasma an inhibitorische kB-Proteine (I κ Bs) gebunden und können dadurch nicht in den Zellkern wandern. Bei einer Aktivierung der NF κ B-Signalkaskade wird I κ B von IKK (I κ B Kinase Komplex) phosphoryliert, welcher aus zwei katalytischen Untereinheiten IKK α und IKK β , sowie einer regulatorischen Einheit, IKK γ (auch NEMO genannt, von: *NF- κ B essential modulator*), besteht. Das phosphorylierte I κ B wird degradiert und lässt das NF κ B-Dimer frei, welches dann in den Zellkern wandern und Zielgene aktivieren kann (Maeda and Omata, 2008).

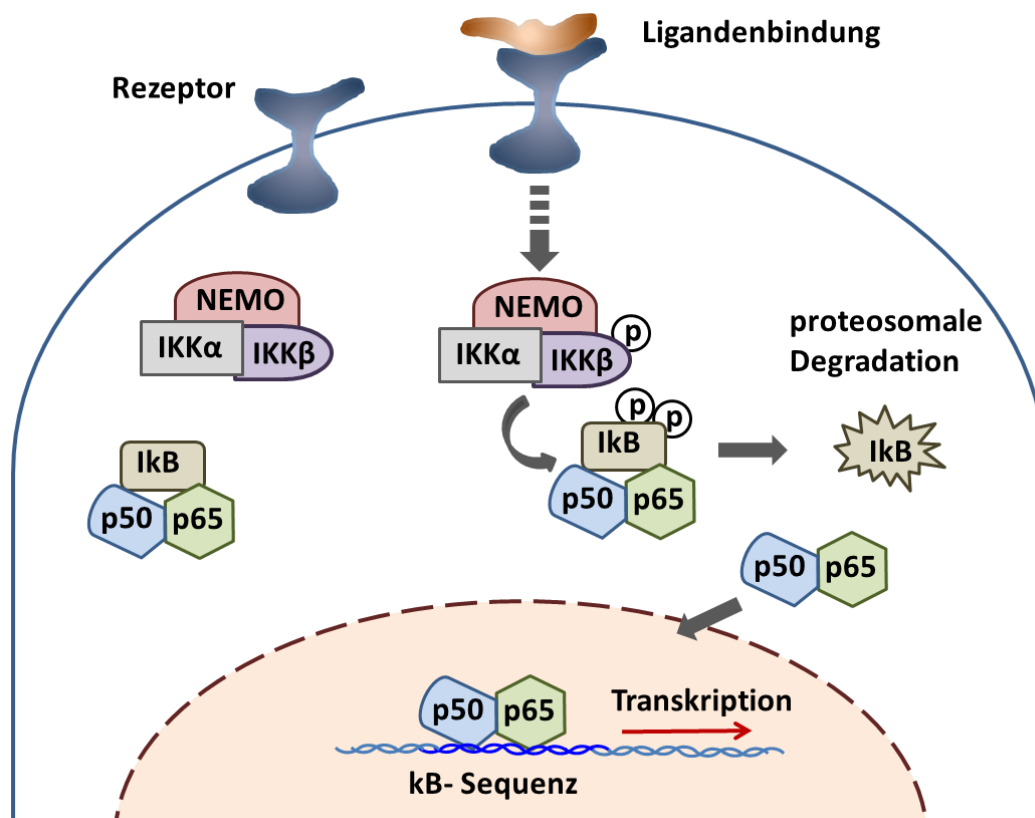


Abbildung 2: Schematische Darstellung der kanonischen NFκB-Signalkaskade.

Die Aktivierung des angeborenen Immunsystems führt zu einer Kaskade von Schutzmechanismen, einschließlich der Produktion verschiedener immunmodulatorischer Faktoren wie Zytokine, welche dann unter anderem die adaptive Immunantwort einleiten (Hoebe et al., 2004). Auch die Expression von Abwehrfaktoren wie antimikrobiellen Peptiden und Muzinen, den Hauptbestandteilen der Mukusschicht, wird als Schutzreaktion gegenüber der Pathogene induziert (Bevins et al., 1999; Liévin-Le Moal and Servin, 2006).

1.3.2.3 Antimikrobielle Peptide

Antimikrobielle Peptide (AMPs) sind endogene Antibiotika mit einem breiten antimikrobiellen Wirkungsspektrum gegen Viren, Bakterien, Pilze und Protozoen (Boman, 1995). Zu den bisher bekannten AMPs zählen unter anderem verschiedene Defensine, Lysozym, Cathelicidin LL-37 und antimikrobielle Antiproteasen. Hunderte von AMPs wurden bereits entdeckt, welche unabhängig von ihrer Herkunft, ihrem Wirkungsspektrum und ihrer Struktur zum größten Teil folgende Eigenschaften teilen: sie bestehen aus maximal 60

Aminosäuren, sind positiv geladen und besitzen einen amphipathischen Charakter (Zasloff, 2002). Zu einer der wichtigsten AMP-Gruppen im Gastrointestinaltrakt gehören Defensine, welche nach ihrem Disulfidbrücken-Muster und ihrer Tertiär-Struktur in α - und β -Defensine aufgeteilt werden. Die α -Defensine kommen in den neutrophilen Leukozyten (*human neutrophil peptides*, HNP 1-4) (Ganz et al., 1985) und in den Paneth'schen Körnerzellen (*human defensins*, HD 5 und 6) des Dünndarms vor (Wehkamp et al., 2006). Die β -Defensine werden in Epithelzellen des Dünn- und Dickdarms exprimiert, sind aber auch in anderen Geweben zu finden (Bals et al., 1998; Fahlgren et al., 2004; Harder et al., 2001; Zhao et al., 1996). Zu den bedeutendsten β -Defensinen des menschlichen Gastrointestinaltraktes zählen HBD1 bis 4 (*human beta defensin 1-4*) (Harder et al., 2007). Die Mechanismen der antimikrobiellen Wirkung sind noch nicht vollständig verstanden. Ein möglicher Mechanismus ist im sogenannten „Shai-Matsuzaki-Huang-Model“ beschrieben. Dieser beruht auf der positiven Ladung, welche den AMPs ermöglicht, sich in die negativ geladene bakterielle Membran einzulagern und diese durch Porenbildung zu zerstören (Papo and Shai, 2005). Einige der Defensine werden konstitutiv exprimiert, wie zum Beispiel HD5 und -6 in den Paneth'schen Körnerzellen oder HBD1 im Dickdarmepithel (Jones and Bevins, 1992; Ouellette, 2004; Zhao et al., 1996). Andere Defensine wie zum Beispiel HBD2 werden dagegen im Fall einer Infektion durch bestimmte mikrobielle oder endogene Komponenten induziert, um die Abwehr der Barriere zu stärken (O'Neil et al., 1999; Schlee et al., 2007). Zusätzlich zu ihrer antibiotischen Wirkung haben viele AMPs weitere Funktionen. Zum Beispiel lösen einige AMPs eine chemotaktische Wanderung von Immunzellen aus oder stimulieren die Expression von Transkriptionsfaktoren, Integrinen, Chemokinen sowie ihren Rezeptoren. Außerdem neutralisieren bestimmte AMPs schädliche endogene und mikrobielle Faktoren (Oppenheim et al., 2003). Zum Beispiel haben Elafin und SLPI (*secretory leucocyte protease inhibitor*) neben ihrer Funktion als Serin-Antiproteasen eine wichtige Rolle als AMPs gegen ein breites Spektrum an Mikroorganismen. Dabei wurde Elafin im Gastrointestinaltrakt sowohl in Immun- als auch in Epithelzellen und SLPI nur in den Immunzellen gefunden (Schmid et al., 2007; Simpson et al., 1999; Williams et al., 2006). Während einer Entzündung werden Proteasen in großen Mengen freigesetzt. Sie dienen der Abwehr von Pathogenen und ermöglichen außerdem den Leukozyten das Wandern durch die extrazelluläre Matrix. Allerdings können sie auch eine Zerstörung des Gewebes

verursachen. Antiproteasen wie Elafin und SLPI werden deshalb exprimiert, um den Effekten der aggressiven Proteasen entgegenzuwirken (Hiemstra, 2002).

1.3.3 Mukus und Muzine: Aufbau und Funktion

Ein Hauptbestandteil der intestinalen Barriere ist die Mukusschicht, welche das Darmepithel auskleidet. Die Mukusschicht hat zwei wesentliche Funktionen im Gastrointestinaltrakt: Zum einen befeuchtet der Mukus die Darmschleimfläche und erleichtert dadurch die Passage des Darminhalts. Zum anderen dient dieser der Abgrenzung zwischen intestinalem Epithel und dem Inhalt des Darmlumens mit dem darin befindlichem Nahrungsbrei, schädlichen Substanzen und Abbauprodukten. Dennoch besteht eine selektive Durchlässigkeit für bestimmte niedermolekulare Komponenten wie Nährstoffe, Gase etc. (Allen and Flemström, 2005; Kim and Ho, 2010). Die Mukusschicht schützt das Darmepithel auch vor den im Darmlumen natürlich vorkommenden kommensalen Mikroorganismen sowie vor pathogenen Bakterien und Viren (Hansson, 2012). Dabei bietet der Mukus nicht nur durch eine physikalische Barriere einen Schutz, sondern auch durch die vom Epithel in die Mukusschicht sezernierten und darin gebundenen AMPs (Antoni et al., 2013). Die viskose Schleimschicht besteht zu 95% aus Wasser und darin eingelagerten Salzen, Lipiden, Kohlenhydraten und Proteinen wie Immunglobulinen, Wachstumsfaktoren und TFFs (*trefoil factors*). Seinen viskosen Charakter verdankt der Mukus den sekretorischen Muzinen, 1 – 20×10^6 Dalton großen Glykoproteinen, welche von den Becherzellen ins Darmlumen sezerniert werden (Allen and Pearson, 1993). Die Dicke der Mukusschicht variiert je nach Abschnitt des Darmtraktes und korreliert mit der Bakteriendichte. Dabei entsteht ein Gradient vom schwächer besiedelten Dünndarm, in dem das Epithel von einer dünnen und zum Teil diskontinuierlichen Mukusschicht bedeckt ist, zum sehr dicht besiedelten Dickdarm und Rektum mit einer Mukusdicke von bis zu 155 μm (Pullan et al., 1994).

In mehreren Studien wurde gezeigt, dass die Mukusschicht im Magen und Dickdarm in zwei Schichten organisiert ist. Die äußere nicht-adhärenente Mukusschicht ist durch stärkeres Einlagern von Wasser und mikrobieller Degradation lockerer und dicker. Sie ist von intestinalen Keimen besiedelt, wird ständig abtransportiert und sorgt für eine reibungslose Darmpassage und das Abführen von schädlichen Stoffen und Mikroorganismen. Die innere adhärenente Mukusschicht ist dagegen sehr dicht und haftet fest am Darmepithel. Im

Unterschied zu der äußeren Schicht ist diese steril und hält die Darmflora fern vom Epithel. Im Dünndarm konnte man dieses Phänomen wegen der geringen Dicke und einem diskontinuierlichen Charakter der Mukusschicht nicht feststellen (Johansson et al., 2008; Matsuo et al., 1997).

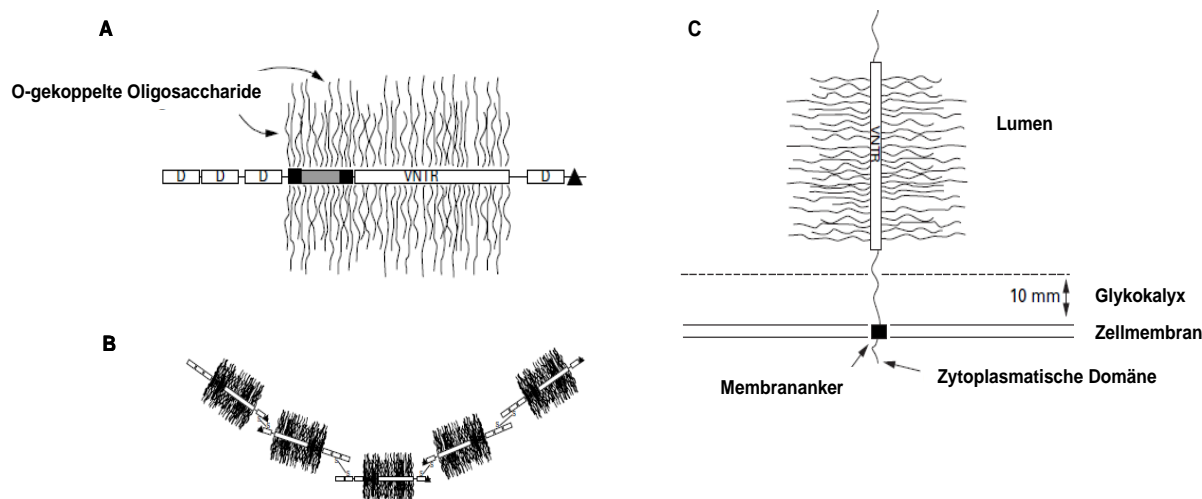


Abbildung 3: Die Struktur des sekretorischen Muzins Muc2 (A) und seinen Oligomeres (B), und die Struktur des membranständigen Muzins Muc1 (C). D: von Willebrand Domänen; VNTR: *variable number of tandem repeats*. (nach Shirazi et al., 2000)

Neben den sekretorischen, mukusformenden Muzinen bildet das Epithel auch membranständige Muzine, welche in die Zellmembran auf der apikalen Seite eingebaut werden (Dekker et al., 2002). Bislang sind 21 verschiedene Muzine bekannt, die mit der Abkürzung „Muc“ und einer Nummer bezeichnet werden (Boltin et al., 2013). Muzine werden an verschiedenen Epitheloberflächen produziert und zeigen eine gewebespezifische Verteilung (Linden et al., 2008). So ist im Dickdarm Muc2 das am stärksten exprimierte strukturgebende Muzin der Mukusschicht. Zu den häufigsten membranständigen Muzinen des Dickdarms zählen Muc1, Muc3 und Muc4 (Shirazi et al., 2000; Tytgat et al., 1994). In Abbildung 3 ist die Struktur der Muzine am Beispiel des sekretorischen Muzins Muc2 und des membranständigen Muzins Muc1 dargestellt. Allen Muzinen gemein ist die sogenannte VNTR-Domäne (*variable number of tandem repeats*), ein linear aufgebauter Proteinkern, welcher reich an den Aminosäuren Prolin, Serin und Threonin ist. Die VNTR-Domäne ist durch eine hohe Anzahl an O-verknüpften Oligosacchariden, welche bis zu 85% der

molekularen Masse ausmachen, stark glykosyliert. Dies verleiht den Muzinen ihre hohe hydrodynamische Eigenschaft und Viskosität. Dabei ist die VNTR-Domäne in der Aminosäuresequenz, der Anzahl der Wiederholungseinheiten und damit auch im Grad der Glykosylierung für jedes Muzin spezifisch (Shirazi et al., 2000). Des Weiteren sind die Oligosaccharide eines bestimmten Muzins variabel. Sie können aus 2 bis 20 Monosacchariden bestehen, linear oder verzweigt sein und neutral sein oder eine negative Ladung tragen. Einige der sekretorischen Muzine wie Muc2 besitzen cysteinreiche „von Willebrand-Faktor Domänen“, welche durch Bildung von Disulfidbrücken zur Polymerisierung und damit zur Ausbildung der gelartigen Struktur des Mukus beitragen (Dekker et al., 2002).

Die membranständigen Muzine wie zum Beispiel Muc1 haben eine extrazelluläre Domäne, die den VNTR-Bereich miteinschließt, eine hydrophobe Transmembrandomäne, mit welcher sie in der Zellmembran verankert sind, und einen zytoplasmatischen Teil. Die membranständigen Muzine haben vielfältige Funktionen. Sie schützen zum Beispiel die Zelloberfläche vor Proteolyse und mikrobiellen Eindringlingen und beeinflussen die Zell-Zell-Adhäsion. Außerdem können die membranständigen Muzine mit ihrer extrazellulären Domäne als Rezeptoren für verschiedene Liganden, zum Beispiel für bakterielle Bestandteile, fungieren und in die Zellsignalgebung eingreifen (Carson, 2008; Lillehoj et al., 2004). Für Muc1 wurde beschrieben, dass es mit seiner 72-Aminosäuren langen intrazellulären Domäne in verschiedene Signalwege wie Wnt, NFkB, MAPK und STAT1 involviert ist (Ahmad et al., 2007; Baldus et al., 2004a; Khodarev et al., 2010; Ueno et al., 2008).

1.4 Erkrankungen des Gastrointestinaltraktes

1.4.1 Chronisch entzündliche Darmerkrankungen

Unter chronisch entzündlichen Darmerkrankungen (CED) versteht man eine schwere, in Schüben verlaufende Entzündung des Gastrointestinaltraktes, begleitet von starken Bauchschmerzen, blutiger Diarrhö und häufigem Stuhldrang (Podolsky, 2002). Dabei lassen sich nach klinischen und histopathologischen Charakteristika zwei Hauptgruppen von CED unterscheiden: Morbus Crohn (MC) und Colitis ulcerosa (CU). Obwohl beide Erkrankungen viele Gemeinsamkeiten haben, lassen sie sich dennoch deutlich voneinander unterscheiden. Bei CU beginnt die Entzündung im Rektum und kann sich von dort über den ganzen

Dickdarm ausbreiten, wobei sie in der Regel auf diesen beschränkt bleibt. Dabei ist nur die äußere Darmwandschicht von der Entzündung betroffen, welche sich lückenlos über die Mukosa ausbreitet. MC kann dagegen jeden Abschnitt des Verdauungstraktes befallen, tritt aber vorwiegend im Dün- oder Dickdarm oder in beiden Abschnitten gleichzeitig auf. In einem von MC befallenen Abschnitt wechseln sich die entzündeten und nicht entzündeten Areale mosaikartig ab. Dabei sind alle Schichten der Darmwand von der Entzündung betroffen, so dass es auch häufig zur Entstehung von Fisteln und Stenosen kommt (Stange, 2009). Die Inzidenz für MC liegt weltweit zwischen 1,6 und 14,6 und für CU zwischen 2,6 und 24,5 pro Jahr pro 100.000 Einwohner und ist in Nord- und Westeuropa sowie in Nordamerika am höchsten (Lakatos, 2006).

Die Entstehungsmechanismen von CED sind noch nicht vollständig aufgeklärt. Dabei ist generell anerkannt, dass beide Erkrankungen multifaktoriellen Charakters sind, wobei die Wechselwirkungen sowohl von genetischen als auch von Umweltfaktoren bei der Krankheitsentstehung diskutiert werden (Stange, 2009). Lange Zeit orientierte sich die CED-Forschung vorwiegend in Richtung einer hypersensitiven, adaptiven Immunantwort gegenüber intestinalen Bakterien (Duchmann et al., 1995; Fiocchi, 1990; Schreiber et al., 1992). Auch wurde zunächst vermutet, dass es sich bei CED um Autoimmunerkrankungen handelt, wobei diese Hypothese mittlerweile weitgehend in den Hintergrund getreten ist (Fiocchi, 1998; Snook et al., 1989). In den letzten Jahren häuften sich die Hinweise für eine primär gestörte mukosale Barriere gegenüber der intestinalen Darmflora als Auslöser von CED. In einem gesunden Darm besteht hingegen ein Gleichgewicht zwischen der intestinalen Mikroflora und der mukosalen Abwehr, welches den Bakterien eine ökologische Nische erlaubt und gleichzeitig das Darmepithel schützt. Nach der Hypothese der gestörten mukosalen Barriere ist dieses Gleichgewicht durch spezifische Defekte gestört, die den intestinalen Keimen ermöglichen, diese Barriere immer wieder zu überwinden und eine chronische Entzündung auszulösen (Jäger et al., 2013; Wehkamp et al., 2008).

1.4.1.1 Mikrobiota bei chronisch entzündlichen Darmerkrankungen

Es ist mittlerweile unumstritten, dass die Mikrobiota eine zentrale Rolle in der Pathogenese von CED spielt. Es wurde mehrmals eindrucksvoll gezeigt, dass sich die intestinalen Bakterien im Kolon von CED-Patienten im direkten Kontakt mit dem Epithel befinden und sogar in die

Zellen eindringen, wogegen bei gesunden Probanden die an das Epithel grenzende Mukusschicht steril ist (Johansson et al., 2013; Swidsinski et al., 2002). Auffällig ist auch, dass CED vorwiegend in den Abschnitten des Gastrointestinaltraktes mit der höchsten bakteriellen Dichte auftritt (Gersemann et al., 2012). Es wurde gezeigt, dass operatives Abführen des Stuhls von den betroffenen Dünndarmabschnitten von MC-Patienten zu einem besseren Abheilen dieser führte (D’Haens et al., 1998). Es wurde ebenfalls berichtet, dass der Einsatz von Antibiotika bei der Behandlung von CED einen positiven Einfluss auf den Heilungsprozess ausübt (Wang et al., 2012). Auch in Tierversuchen wurde gezeigt, dass die Anwesenheit der Darmmikrobiota nötig ist, um eine Entzündung in Colitis-Modellen auszulösen (Dianda et al., 1997; Rath et al., 1999; Sellon et al., 1998). Manche Pathogene werden direkt mit CED assoziiert wie zum Beispiel *Mycobacterium paratuberculosis*. In zwei Dritteln der untersuchten Gewebeproben von MC-Patienten mit Dünndarm- sowie Dickdarmbefall konnte DNA von diesem Keim nachgewiesen werden, während diese in CU-Patienten kaum entdeckt wurde (Sanderson et al., 1992). Darüber hinaus ist der adhärent invasive *E. coli* (AIEC) stark mit MC des Dünndarms assoziiert, während er im Dickdarm von MC-Patienten kaum und bei CU-Patienten gar nicht gefunden wurde (Darfeuille-Michaud et al., 2004).

Außerdem wurde eine veränderte Zusammensetzung und eine verminderte Biodiversität der Darmmikroorganismen bei CED-Patienten in vielen Studien festgestellt (Tamboli et al., 2004). So wurde zum Beispiel ein reduziertes Auftreten von *Firmicutes*, unter anderem des entzündungshemmenden *Faecalibacterium prausnitzii*, in CED-Patienten beobachtet (Galecka et al., 2013; Machiels et al., 2013). Auch ein verringerter Anteil an *Bifidobacteria* sowie eine Veränderung in deren Zusammensetzung, die auf eine Verschiebung der Häufigkeit einzelner *Bifidobacteria* Arten zurückzuführen ist, wurden bei CED beobachtet (Gueimonde et al., 2007). Des Weiteren wurde ein vermehrtes Vorkommen von *E. coli* (Packey and Sartor, 2008; Sokol et al., 2008; Walker et al., 2011), *Bacteroides* und *Prevotella* (Lucke et al., 2006) im Zusammenhang mit CED berichtet. Außerdem konnte in Tierversuchen gezeigt werden, dass nicht nur die Anwesenheit, sondern auch die Zusammensetzung der Darmbakterien für die Entwicklung einer experimentellen Colitis entscheidend ist (Waidmann et al., 2003). Allgemein wird in vielen Studien eine Verschiebung von nützlichen zu potentiell schädlichen Mikroorganismen im Darm der CED Patienten angedeutet (Packey and Sartor, 2008).

1.4.1.2 Probiotika bei chronisch entzündlichen Darmerkrankungen

Probiotika sind lebende Bakterien, welche ihrem Wirt gesundheitliche Vorteile bringen (Fuller, 1989). Es gibt zahlreiche Studien zur Wirkung von Probiotika bei CED, die jedoch oft widersprüchliche Schlussfolgerungen ziehen. Allgemein kann man sagen, dass das Verabreichen von Probiotika bei CU-Patienten die Remissionsphase zu verlängern scheint. Bei MC hingegen wurden bisher noch keine Erfolge einer Probiotikatherapie bestätigt (Mack, 2011). Dabei wurden folgende Effekte von Probiotika beobachtet, welche zur Verbesserung des Krankheitsbildes führen könnten: bei Patienten mit aktiver CU trat nach dem Verabreichen von *Bifidobacterium longum* eine Verminderung der histologischen Entzündung und der proinflammatorischen Zytokine TNF α und IL-1 α im Darmgewebe ein (Furrie et al., 2005). Die Behandlung von CU-Patienten mit *Lactobacillus delbruekii* und *Lactobacillus fermentum* führte zum Rückgang der proinflammatorischen Zytokine IL-6 und TNF α sowie zu einer schwächeren Aktivität der NFkB-Signalkaskade, einer geringeren Anzahl an Leukozyten im Dickdarmgewebe und weniger Calprotektin im Stuhl (Hegazy and El-Bedewy, 2010).

Auch in Tiermodellen für Colitis haben sich Probiotika als positiv, jedoch nicht als Wundermittel erwiesen. Dabei unterscheidet sich die Effektivität je nach Colitis-Modell und/oder probiotischem Stamm. In IL-10-defizienten Mäusen zum Beispiel, welche eine Crohn-ähnliche Colitis entwickeln, führte die Behandlung mit VSL#3, einer probiotischen Mischung aus Bifidobakterien und Laktobazillen, zur Absenkung der proinflammatorischen Zytokine IFN γ und TNF α in der Mukosa, einer Besserung der histologischen Entzündung und des Allgemeinzustandes der Tiere (Madsen et al., 2001).

Da die CED-Pathogenese einen multifaktoriellen Charakter hat und sowohl von äußeren als auch von genetischen Faktoren getragen wird, wird spekuliert, dass ein Einbeziehen des individuellen genetischen Hintergrunds des Patienten in Kombination mit der Verwendung bestimmter Bakterien die Effektivität des Probiotika-Einsatzes steigern könnte. Weitere Studien sind notwendig, um die Wirkung der Probiotika zu spezifizieren und weitere Wirkungsmechanismen zu entdecken (Mack, 2011).

1.4.2 Intestinale Krebserkrankungen

In der europäischen Union ist Dickdarmkrebs die zweithäufigste und in den USA die dritthäufigste Krebsart (Ferlay et al., 2013; Hagggar and Boushey, 2009). Eine chronische Entzündung wird als treibende Kraft für die Entstehung vieler Krebsarten vermutet (Coussens and Werb, 2002; Maeda and Omata, 2008). So ist das Risiko für ein kolorektales Karzinom (CRC, *colorectal cancer*) bei CED Patienten mit Dickdarmbefall sowohl bei CU als auch bei MC erhöht. Man spricht in diesem Fall auch von Colitis-assoziiertem Krebs (CAC, *colitis associated cancer*). Das Risiko für CAC korreliert zudem mit der Dauer und Schwere der Erkrankung (Rizzo et al., 2011).

An der Entstehung von entzündungsbedingten Tumoren sind viele Prozesse beteiligt. Während der Entzündung werden vermehrt freie Radikale freigesetzt, was zu oxidativem Stress und DNA-Schädigung führt (Reuter et al., 2010). Die Immunzellen produzieren verschiedene Zytokine und Wachstumsfaktoren, welche die Tumorentwicklung beeinflussen (Monteleone et al., 2012). Ein Entzündungsprozess setzt die Aktivierung bestimmter Signalwege in Gang, welche unter anderem die Proliferation und Apoptose steuern. Mehrere Signalwege wie Wnt, STAT3 und NFkB werden als eine Verbindung zwischen Entzündung und Krebsentstehung gesehen (Terzić et al., 2010).

1.4.2.1 Mikrobiota bei intestinalen Krebserkrankungen

Wie bei CED wird bei der Entstehung von CRC der intestinalen Mikrobiota im Zusammenspiel mit einer genetischen Prädisposition eine besondere Rolle zugeschrieben (Sobhani et al., 2013). So konnte die Gruppe um Swidsinski im Fall von CRC zeigen, dass Mukosa-adhärenzte und invasive *E. coli* Arten vorhanden sind (Swidsinski et al., 1998). Auch wurde eine veränderte Zusammensetzung der Darmmikrobiota in CRC-Patienten im Vergleich zu gesunden Probanden beobachtet (Shen et al., 2010; Sobhani et al., 2013). Die Anwesenheit von Darmbakterien allgemein scheint eine pro-karzinogene Wirkung zu haben (Reddy et al., 1975; Sacksteder, 1976; Vannucci et al., 2008). So wurden im menschlichen Stuhl mutagene und genotoxische Substanzen bakteriellen Ursprungs gefunden. Auch die Nahrungsbestandteile können durch bakterielle Enzyme wie β -Glucuronidase und β -Glycosidase zu karzinogenen Substanzen umgewandelt werden. *Bifidobacterium* und *Lactobacillus* zeigen dabei eine schwache Aktivität solcher Enzyme im Vergleich zu

Bacteroides, *Eubacteria* und *Clostridia*, so dass eine Verschiebung des Verhältnisses dieser Stämme die Tumorbildung fördern könnte (Burns and Rowland, 2000).

Wie bei CED werden bestimmte Keime auch mit der Entstehung von Krebs assoziiert. Das prominenteste Beispiel hierfür ist wohl *Helicobacter pylori*, welches für die Entstehung der meisten Magentumore verantwortlich ist (Forman et al., 1991). Außerdem wurde gezeigt, dass *H. pylori* den Wnt-Signalweg aktiviert und so die epitheliale Proliferation anschiebt (Gnad et al., 2010). Bei Patienten mit kolorektaler Neoplasie wurden zudem vermehrt zirkulierende Antikörper gegen *Streptococcus gallolyticus* gefunden (Abdulmir et al., 2011). Für die Entwicklung des CRC in Mausmodellen ist, genauso wie auch für CED, die Anwesenheit aber auch die Zusammensetzung der Darmflora entscheidend. Zum Beispiel entwickelten IL-10-knockout-Mäuse mit einer normalen Mikrobiota-Zusammensetzung nach einer Behandlung mit dem krebserregenden Azoxymethan eine Colitis und zahlreiche Tumore im Dickdarm. Dabei korrelierte die Häufigkeit der Tumore mit der Schwere der Colitis. Außerdem war die Entstehung von Karzinomen abhängig von der TLR/Myd88-Signalgebung, was die essentielle Rolle der Darmmikrobiota unterstreicht. Keimfreie IL-10-defiziente Mäuse blieben in diesem Fall entzündungsfrei und entwickelten kein CRC (Uronis et al., 2009).

1.4.2.2 Probiotika bei intestinalen Krebserkrankungen

Bereits vor 150 Jahren wurde beobachtet, dass sich manche Bakterien negativ auf Tumorwachstum auswirken können (Oelschlaeger, 2010a). Heute werden Mikroorganismen als potentielle Krebs-Therapeutika intensiv erforscht. So wurden in Tierversuchen und humanen Studien anti-karzinogene Wirkungen von Probiotika gezeigt (Burns and Rowland, 2000; Zhu et al., 2011), auch wenn der genaue Wirkmechanismus der Probiotika auf die Karzinogenese nicht verstanden ist. In wenigen humanen Studien konnte zum Beispiel eine Reduktion mutagener Substanzen im Stuhl nach Behandlung mit Probiotika gezeigt werden (Rafter et al., 2007; Zhu et al., 2011). Studien, welche eine positive therapeutische Wirkung von Probiotika wie zum Beispiel von *E. coli* Nissle bei CED demonstrierten, lassen vermuten, dass die Verminderung der chronischen Entzündung auch das entzündungsbedingte Krebsrisiko minimiert (Oelschlaeger, 2010b). In Tierversuchen mit Nagern, die mit karzinogenen Substanzen und zusätzlich mit *Bifidobacterium longum* behandelt wurden,

beobachtete man eine schwächere Tumorbildung in Kolon, Leber und Milchdrüsengewebe (Reddy and Rivenson, 1993). In Zellkulturversuchen zeigten *Bifidobakterien* zudem eine antiproliferative Wirkung auf Kolontumor-, Magentumor- und Leukämiezellen (Lee et al., 2008). Aus den *in vivo* und *in vitro* Studien kann man die anti-karzinogene Wirkung durch folgende Eigenschaften erklären: Probiotika verdrängen schädliche Bakterien, inaktivieren toxische Substanzen, verstärken eine Immunreaktion gegen den Tumor und hemmen Überproliferation (Oelschlaeger, 2010b).

1.4.3 Barrieredefekte bei Erkrankungen des Gastrointestinaltraktes

Wie oben beschrieben stellt die mukosale Barriere ein aus vielen Faktoren bestehendes Abwehrsystem dar, welches das Eindringen der Mikroorganismen in die Mukosa verhindert. In den letzten Jahren häufen sich Studien, welche immer weitere Defekte dieser Barriere aufdecken und diese mit intestinalen Erkrankungen assoziieren (Jäger et al., 2013; Stange, 2009). Die Defekte betreffen viele einzelne Komponenten der schützenden Barriere und lassen ein wachsendes und immer komplexeres Bild entstehen.

1.4.3.1 Gestörte Produktion und Funktion antimikrobieller Peptide

Der MC des Dünndarms ist mit einer verminderten Expression der wichtigsten AMPs der Paneth'schen Körnerzellen, den α -Defensinen HD5 und HD6 assoziiert. Die niedrigen Level der α -Defensine sind dabei unabhängig vom Entzündungsstatus und daher primärer Natur (Wehkamp et al., 2005). Dieser Effekt ist bei Patienten mit einer Mutation im Gen, welches für den interzellularen NOD2-Rezeptor kodiert, verstärkt (Wehkamp et al., 2004a). Zusätzlich konnten auch Defekte im Wnt-Signalweg mit dem Dünndarmsubphänotyp des MC und der verringerten Expression von HD5 und HD6 in Verbindung gebracht werden (Wehkamp et al., 2007). Dieser Zusammenhang wird später noch im Detail diskutiert.

Bei MC des Dickdarms besteht eine defekte Induktion der β -Defensine HBD2, HBD3 und HBD4 in der Entzündung, während diese AMPs im Dickdarm von CU-Patienten in der Entzündungsphase vermehrt induziert werden und so die antimikrobielle Abwehr verstärken (Fahlgren et al., 2004; Wehkamp et al., 2002, 2003). Bei HBD1 wurde ein Einzelnukleotid-Polymorphismus oder SNP (*single nucleotide polymorphism*) in der Promotorregion, welche

über den nuklearen Rezeptor PPAR γ (*peroxisome proliferator-activated receptor gamma*) reguliert wird (Peyrin-Biroulet et al., 2010), mit einem erhöhten Risiko für MC des Kolons assoziiert (Kocsis et al., 2008). Für die antimikrobielle Effektivität von HBD1 könnte zudem ein vor kurzem entdeckter Mechanismus von hoher Relevanz sein. Von diesem AMP hat man lange Zeit angenommen, dass es kaum antimikrobiell aktiv sei, wobei alle Experimente in sauerstoffreicher Umgebung durchgeführt wurden. Erst als HBD1 im sauerstoffarmen Milieu getestet wurde, welches den Bedingungen im Dickdarm entspricht, wurde seine breite antimikrobielle Wirkung gegen Bifidobakterien, Lactobazillen und *C. albicans* offensichtlich. Dies hängt mit der Reduktion seiner Disulfid-Brücken und der dadurch veränderten räumlichen Struktur des Defensins zusammen (Schroeder et al., 2011). Die Reduktion von HBD1 wird durch bestimmte im Darm vorkommende redoxaktive Faktoren wie Thioredoxin-1 vermittelt. Die Expression von Thioredoxin-1 ist bei CED des Kolons vermindert und könnte somit zu einer geschwächten Aktivierung von HBD1 führen (Jaeger et al., 2013; Schroeder et al., 2011).

Neben den Defensinen wiesen auch andere AMPs mit CED assoziierte Defekte auf. Beispielsweise wurde im Dickdarm von MC-Patienten mit Kolonbefall, im Unterschied zu CU-Patienten, eine reduzierte Induktion der antimikrobiellen Antiproteasen Elafin und SLPI (*secretory leucocyte protease inhibitor*) (Schmid et al., 2007) aber auch Cathelicidin LL-37 während der Entzündung beobachtet (Schauber et al., 2006).

1.4.3.2 Defekte der Mukusschicht

Auch Muzine werden mit intestinalen Erkrankungen wie CED und Krebs assoziiert. In mehreren Studien wurde beobachtet, dass die Expression von Muc1 im Darm von CED-Patienten erhöht ist (Furr et al., 2010; Gersemann et al., 2009; Longman et al., 2006). In den meisten Adenokarzinomen wurde ebenfalls eine Muc1-Überexpression aber auch eine Hyperglykosylierung entdeckt, wobei die Überexpression mit dem Progress der Karzinogenese und Metastasierung korreliert. Dabei ist Muc1 nicht nur auf der apikalen Seite, wie es im gesunden Gewebe der Fall ist, sondern an allen Seiten der Zelle zu finden. Während einer Muc1-Überexpression kommt es zu einer herabgesetzten Zell-Zell-Adhäsion und Immunsuppression, was die Karzinogenese und Metastasierung begünstigt (Baldus et al., 2004b; Horm and Schroeder, 2013). Wie bereits erwähnt, interagiert der zytoplasmatische

Teil von Muc1 mit verschiedenen Proteinen im Zellinneren und greift damit in Signalkaskaden wie Wnt ein, welche Differenzierung und Proliferationsprozesse reguliert (Carson, 2008). So wurde entdeckt, dass im Magenkarzinom von mit *H. pylori* infizierten Patienten das Wnt-Zielgen Cyclin D1 unter anderem auch über die zytoplasmatische Muc1-Domäne induziert wird. Die Aktivierung des Wnt-Signalweges durch Muc1 könnte wesentlich zur Entstehung von Tumoren beitragen (Udhayakumar et al., 2007).

Es wurde in mehreren Arbeiten beschrieben, dass im Kolon von Patienten mit aktiver CU die Dicke der Mukusschicht verringert ist, wobei bei MC-Patienten eine normale oder sogar stärkere Mukusschicht entdeckt wurde (McCormick et al., 1990; Pullan et al., 1994; Strugala et al., 2008; Swidsinski et al., 2007). In vielen Studien wurde eine veränderte Expression der Muzine, unter anderem auch von Muc2, beobachtet, wobei die Ergebnisse zum Teil widersprüchlich sind (Dorofeyev et al., 2013; Gerseemann et al., 2009; Hanski et al., 1999; Van Klinken et al., 1999; Moehle et al., 2006; Tytgat et al., 1996). Zudem gibt es Hinweise dafür, dass die posttranskriptionelle Modifikation des Muc2-Proteins verändert ist. So wurde im Dickdarm von CU-Patienten eine verminderte Sulphatierung und eine erhöhte Sialylierung festgestellt (Hanski et al., 1999; Parker et al., 1995). Auch die Oligosaccharidketten scheinen bei CU-Patienten kürzer zu sein (Clamp et al., 1981). Diese Abweichungen könnten zu einer veränderten Widerstandsfähigkeit gegenüber degradierender Enzyme und damit zur Modifikation der viskosen Eigenschaften des Mukus und zur Abschwächung dessen Schutzfunktion beitragen (Strugala et al., 2008). Eine andere Hypothese besagt, dass auf Grund eines veränderten Expressionsmusters von intestinalen Differenzierungsfaktoren die Becherzellen eventuell in ihrer Ausreifung und/oder Funktion gestört sind und damit die Mukusqualität verändert ist (Gerseemann et al., 2009). Auch die Anzahl der Becherzellen scheint im Kolon von Patienten mit aktiver CU reduziert zu sein (Gerseemann et al., 2009; Longman et al., 2006; McCormick et al., 1990; Swidsinski et al., 2007). Eine andere Arbeit postuliert wiederum eine mögliche verstärkte Degradation von Mukus durch eine erhöhte Proteinaseaktivität im Dickdarm von CU-Patienten (Bustos et al., 1998). Auch eine erhöhte Anzahl an Mukus-degradierenden Bakterien wie *Ruminococcus gnavus* und *Ruminococcus torques* wurde mit CED assoziiert (Png et al., 2010).

1.4.3.3 Dysregulation der molekularen Signalgebung

Wie bereits beschrieben, ist der MC des Dünndarms mit einer defekten Expression der in den Paneth'schen Körnerzellen exprimierten α -Defensine HD5 und HD6 assoziiert (Wehkamp et al., 2005). Die Differenzierung der Paneth'schen Körnerzellen ist unter Kontrolle der bereits erwähnten Wnt-Signalkaskade (Andreu et al., 2008; van Es et al., 2005). In den letzten Jahren wurden mehrere Defekte dieses Signalwegs mit der Pathogenese des Dünndarm-Crohns assoziiert. Die Gruppe um Wehkamp hat den Zusammenhang zwischen CED und der Wnt-Signalkaskade aufgedeckt. Dabei konnte gezeigt werden, dass die Expression von TCF4, einem Transkriptionsfaktor der Wnt-Signalkaskade, speziell bei MC-Patienten mit Dünndarmbefall primär erniedrigt ist. Dieser Effekt war unabhängig von der NOD2-Mutation und stellt so einen zusätzlichen Schwachpunkt in der Funktion von Paneth'schen Körnerzellen dar (Wehkamp et al., 2007). Außerdem wurde ein SNP in der Promotorregion des TCF4-Gens mit demselben Subphänotyp des MCs assoziiert (Koslowski et al., 2009). Auch die Expression von LRP6, einem Rezeptor der Wnt-Signalkaskade, scheint bei Dünndarm-Crohn erniedrigt zu sein. Darüber hinaus wurde ein funktioneller SNP in der Exonregion des LRP6-Gens vermehrt bei solchen Patienten entdeckt, welche bereits in der Kindheit an ilealem MC erkrankt waren (Koslowski et al., 2012).

Vor einigen Jahren hat die Arbeitsgruppe um Gerseman gezeigt, dass die Hath1- und KLF4-Expression im Kolon von MC-Patienten während der Entzündung induziert wird. Im Kolon von Patienten mit aktiver CU hingegen fehlte diese Induktion. Da Hath1 ein Differenzierungsfaktor der sekretorischen Zelllinie ist und KLF4 speziell die Reifung der Becherzellen reguliert (van der Flier and Clevers, 2009), ist davon auszugehen, dass die entzündungsbedingte Induktion von Hath1 und KLF4 eventuell einen Schutzmechanismus zur Stärkung der intestinalen Barriere darstellt. Auch die Anzahl reifer Becherzellen in der oberen Hälfte der Krypte war, wie bereits erwähnt, bei aktiver CU im Vergleich zu MC vermindert (Gerseman et al., 2009). Die Gruppe um Zheng hat in immunhistologischen Färbungen der Kolonmukosa von CU-Patienten ebenfalls eine Schwächung der Hath1-Expression und eine Dezimierung der Becherzellzahl beobachtet (Zheng et al., 2011). Hes1, ein Zielgen der Notch-Kaskade, ist dafür bekannt, sich gegenüber Hath1 antagonistisch zu verhalten und die sekretorische Differenzierung zu unterdrücken (van Den Brink et al., 2001). Die fehlende Hath1-Induktion war in der Arbeit von Gerseman et al. jedoch nicht mit einer

gesteigerten Hes1-Expression verbunden und konnte nicht mit einer erhöhten Notch-Aktivität erklärt werden (Gersemann et al., 2009). Zheng et al. dagegen konnten eine verminderte Hath1- und gesteigerte Hes1-Expression in den immunhistologisch gefärbten Krypten von CU-Patienten beobachten (Zheng et al., 2011). Auch bei Kolonkarzinomen, welche stark mit CED assoziiert sind (Rizzo et al., 2011), entdeckte man einen Zusammenhang zu den oben beschriebenen Faktoren. In den meisten Tumoren, unter anderem auch in 80% aller Dickdarmtumore, ist der kanonische Wnt-Signalweg abnormal überaktiviert (White et al., 2012). Eine Überaktivierung der Notch-Signalkaskade wurde ebenfalls stark mit den intestinalen Tumoren assoziiert (Guilmeau, 2012). Demgegenüber sind die als Tumorsuppressoren beschriebenen Faktoren wie Hath1 und KLF4 in dieser Situation herunterreguliert (Choi et al., 2006; Leow et al., 2004).

1.5 Zielsetzung

Die intestinale Mikrobiota spielt bei der Entwicklung, Regeneration und Funktion des Gastrointestinaltraktes eine wichtige Rolle. In den dicht besiedelten Abschnitten des Gastrointestinaltraktes wie Kolon ist die Interaktion zwischen Mikrobiota und Wirt besonders intensiv und komplex. Die multifaktorielle mukosale Barriere, welche die Mikroorganismen in Schach hält, besteht aus vielen ineinander übergreifenden Faktoren und hat einen dynamischen Charakter. Viele Funktionen der intestinalen Barriere wie Produktion von AMPs und Mukus übernimmt das Epithel. Um seine Leistungsfähigkeit und Dynamik aufrechtzuerhalten, muss das Epithel ständig regeneriert werden. Die dabei im Gleichgewicht stehenden Prozesse der Proliferation und Differenzierung und damit auch die Funktionen des Epithels sind fähig, sich bei Bedarf, zum Beispiel im Falle einer Entzündung, flexibel anzupassen. Dieser Prozess wird durch ein Netzwerk aus verschiedenen Signalen, unter anderem Hes1, Hath1 und KLF4, reguliert. Eine Störung in diesem fein regulierten System könnte die Funktion des Epithels und damit die Effektivität der mukosalen Barriere negativ beeinflussen. So werden Defekte der Expression von Differenzierungsfaktoren, aber auch von Muzinen und AMPs mit intestinalen Erkrankungen wie CED und CRC in Verbindung gebracht.

Es ist bekannt, dass intestinale Mikroorganismen viele Funktionen der mukosalen Barriere wie die Expression von Muzinen und AMPs, aber auch die Regeneration des Epithels regulieren können. In diesem Zusammenhang soll in dieser Arbeit der Einblick in den Einfluss der Mikrobiota auf die intestinale Differenzierung, Regeneration und Funktion vertieft werden. Ein weiteres Ziel besteht darin, weitere Hinweise auf den Zusammenhang zwischen Mikrobiota und den Defekten der mukosalen Barriere bei intestinalen Erkrankungen zu bekommen. Dabei wird der Einfluss einzelner intestinaler Keime auf die Regulation der Differenzierungsfaktoren Hes1, Hath1 und KLF4, der Muzine Muc1 und Muc2 und der AMPs HBD2 und Elafin *in vitro* untersucht. Darüber hinaus wird der Frage nachgegangen, ob die Gesamtheit der Mikrobiota die Expression von Hes1, Hath1 und KLF4, aber auch von Muc1 und Muc2 im Darm *in vivo* reguliert.

Des Weiteren sollen in dieser Studie die regulatorischen Mechanismen von *E. coli* Nissle auf die Regulation von Differenzierungsfaktoren, Muzine und AMPs aufgedeckt werden. *E. coli* Nissle ist ein gut untersuchtes und breit eingesetztes Probiotikum. Ein tieferes Verständnis der Interaktion von *E. coli* Nissle mit dem Wirt ist daher wichtig, um die positiven aber auch möglicherweise negativen Effekte einer *E. coli* Nissle-Therapie vorherzusagen und eventuell weitere Indikationsgebiete zu identifizieren.

Entzündungsprozesse werden stark mit der Pathogenese von CRC assoziiert. So sind CED-Patienten einem höheren Risiko ausgesetzt, CRC zu entwickeln. In Entzündungsprozessen spielt die NFkB-Signalkaskade eine zentrale Rolle. Sie ist zudem auch bei der entzündungsbedingten Karzinogenese essentiell. In dieser Arbeit wird daher auch untersucht, ob die Differenzierungsfaktoren Hes1, Hath1 und KLF4 *in vitro* und *in vivo* über die NFkB-Signalkaskade beeinflusst werden, um so einen Einblick in einen möglichen Zusammenhang von Desregulation dieser Differenzierungsfaktoren, Entzündung und CRC-Entstehung zu bekommen.

Zusammenfassend sollen folgende Themen untersucht werden:

1. Der Einfluss einzelner Bakterien auf die Differenzierungsfaktoren Hes1, Hath1 und KLF4, die Muzine Muc1 und Muc2 und die AMPs HBD2 und Elafin *in vitro*
2. Der Einfluss der Mikrobiota in ihrer Gesamtheit auf die Differenzierungsfaktoren Hes1, Hath1 und KLF4, und die Muzine Muc1 und Muc2 *in vivo*
3. Die Wirkungsmechanismen von *E. coli* Nissle
4. Der Einfluss der NFkB-Signalkaskade auf die Regulation von Differenzierungsfaktoren Hes1, Hath1 und KLF4, der Muzine Muc1 und Muc2 und der AMPs HBD2 und Elafin

2. Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Geräte

Gerät	Hersteller
Anaerobiertopf	Oxoid Limited, UK
Bio Photometer	Eppendorf, Deutschland
CG-840 pH-Meter	Schott, Deutschland
Fast Prep 24	MP Biomedicals, Frankreich
Fastblot B43	Biometra, Deutschland
Heizblock DB-2A	Techne, UK
Las-1000	Fujifilm, Japan
Leica DM 4000 B	Leica Microsystems, Deutschland
LightCycler® 480	Roche Applied Science, Deutschland
Mikrobiologische Sicherheitswerkbank	BDK, Deutschland
Multipette	Eppendorf, Deutschland
NanoDrop 2000 Spektrophotometer	Thermo Scientific, USA
Pipetten	Eppendorf, Deutschland
Platten-Reader: Wallac Victor 1420	Perkin Elmer, USA
Power PAC 1000	Bio-Rad, Deutschland
Protean II xi Cell	Bio-Rad, Deutschland
Schüttelapparat Modell 3014	GFL, Deutschland
Schüttler HT	Infors HT, Schweiz
Sonikator Bandelin Sonopuls HD 200	Bandelin, Deutschland
Thermocycler PTC-200	MJ Research, USA
ABI Prism™ 310 Sequencer	Applied Biosystems, Deutschland
Waage: Kern GS	Kern, Deutschland
Wärmeschränk	Binder, Deutschland
Wasserbad GFL 1083	GFL, Deutschland
Zentrifuge 320 R	Hettich, Deutschland
Zentrifuge 5415 D	Eppendorf, Deutschland

2.1.2 Verbrauchsmaterial

Produkt	Hersteller
12-well Kulturplatten	Becton Dickinson, USA
2-well Chamber Slides	Nunc, USA
Columbia Blutagar Platten	Becton Dickinson, USA
Combitips plus	Eppendorf, Deutschland
Deckglas	R. Langenbrinck, Deutschland
DNase-, RNase- freie Reaktionsgefäße	Biozym Scientific, Deutschland
Filterpapier	Roth, Deutschland
Filterspitzen	Eppendorf, Deutschland
Glaspipetten	Corning Incorporated, USA
Kryoröhrchen	Nunc, USA
Neubauer Zählkammer	Roth, Deutschland
Objektträger	R. Langenbrinck, Deutschland
Petrischalen	Greiner Bio-One, Deutschland
Protran BA 83 Nitrocellulosemembran	Schleicher&Schuell, Deutschland
Zellkulturflaschen	Falcon, USA

2.1.3 Chemikalien, Reagenzien, Blocker und andere Produkte

Produkt	Hersteller
1 kb Plus DNA Ladder	Invitrogen, USA
100 bp DNA Ladder	Invitrogen, USA
Ammoniumpersulfat (APS)	Merck, Deutschland
Ampicillin	Sigma-Aldrich, Deutschland
Anti- hTLR5- IgA	Invivogen, USA
Bay 11-7082	Sigma-Aldrich, USA
Bicinchoninsäure	Sigma-Aldrich, USA
Bovines Serumalbumin, BSA	Sigma-Aldrich, USA

Bromphenolblau	Sigma-Aldrich, Deutschland
DePeX Gurr	VWR International, USA
Dibenzazepin, DBZ	Axon Medchem, Niederlande
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma, Deutschland
dNTPs	Promega, USA
EcoRI	New England Biolabs, USA
Ethanol	Roth, Deutschland
fötale Kälberserum, FCS	PAA Laboratories, Österreich
Helenalin	Enzo Life Sciences, Deutschland
HotStarTaq DNA-Polymerase	Qiagen, Deutschland
Kaleidoscope Standard	Biorad, USA
Lambda Proteinphosphatase (Lambda PP)	New England Biolabs, USA
Milchpulver	Fluka, Deutschland
Natriumpyruvat	Gibco Life Technologies, Deutschland
NEB-Puffer 2	New England Biolabs, USA
Neoclear	Merck, Deutschland
Nicht-essentielle Aminosäuren, NEAS	Gibco Life Technologies, Deutschland
Penicillin/Streptomycin-Lösung	Gibco Life Technologies, Deutschland
Phosphat-gepufferten Kochsalzlösung, PBS	Gibco Life Technologies, Deutschland
Protease Inhibitor Cocktail (PIC)	Sigma-Aldrich, Deutschland
Protease Inhibitor Cocktail (PIC), EDTA-free	Sigma-Aldrich, Deutschland
Tetramethylethyldiamin (TEMED)	Roth, Deutschland
Trypsin-EDTA	Roth, Deutschland
Tryptic Soy Broth-Medium, TSB	Becton Dickinson, USA
Tween 20	Sigma-Aldrich, Deutschland
X-Gal	Roth, Deutschland

2.1.4 Molekularbiologische Kits

Produkt	Hersteller
AMV Reverse Transkription System Kit	Promega, USA
Big Dye Terminator V.1.1 Cycle Sequencing Kit	Applied Biosystems, Deutschland
Dako REAL™ EnVision™ Detection System, Peroxidase/DAB+, Rabbit/Mouse	Dako, Dänemark
LightCycler®480 SYBR GreenI Master Kit	Roche, Deutschland
QIAprep Spin Miniprep Kit	Qiagen, Deutschland
QIAquick PCR Purification Kit	Qiagen, Deutschland
RNeasy Mini Kit	Qiagen, Deutschland
SuperSignal West Dura Extended Duration Substrate-Kit	Pierce, USA
TOPO TA Cloning Kit	Invitrogen, USA
VenorGeM® mycoplasma detection kit	Minerva Biolabs GmbH, Deutschland

2.1.5 Puffer, Lösungen und Gele

TAE-Puffer (50x)	Tris	242 g
	Essigsäure	57,1 ml
	0,5 M EDTA pH 8,0	100 ml
	Aqua dest.	auf 1 l auffüllen
Lysepuffer I	Tris-HCl pH7,5	20 mM
	NaCl	150 mM
	EDTA	1 mM
	Triton X-100	1%
	Sodumpyrophosphat	25 mM
	Glycerolphosphat	1 mM
	Na ₃ VO ₄	1 mM
	Harnstoff/Urea	6 M
	Protease Inhibitor Cocktail	1%

Lysepuffer II	Tris-HCl pH 7,5	25 mM	
	NaCl	100 mM	
	Triton X-100	1%	
	Complete, Mini, EDTA-free	1%	
	protease inhibitor cocktail		
<hr/>			
Polyacrylamidgele		Sammelgel	Trenngel, 12%
	H ₂ O	2,7 ml	3,3 ml
	30 % Acrylamid/ Bis Lösung	0,67 ml	4,0 ml
	1,5 M Tris (pH 8,8)	-	2,5 ml
	1,0 M Tris (pH 6,8)	0,5 ml	-
	10 % (w/v) SDS	0,04 ml	0,1 ml
	10 % (w/v) APS	0,04 ml	0,1 ml
	TEMED	0,004 ml	0,004 ml
<hr/>			
SDS-Ladepuffer (5x)	Tris HCl (pH 6,8)	250 mM	
	Bromphenolblau	0,01%	
	SDS	5%	
	β-Mercaptoethanol	5%	
	Glycerin	40%	
<hr/>			
Laufpuffer (10x)	Glycin	192 mM	
	Tris	250 mM	
	SDS	35 mM	
<hr/>			
TBS (10x)	NaCl	400 g	
	KCl	10 g	
	Tris-Base	150 g	
	HCl	pH 7,4 einstellen	
	H ₂ O	auf 5 l auffüllen	

TBS-T	TBS	1x in H ₂ O
	Tween20	1%
Transferpuffer	Tris-Base	29 g
	Glycin	14,6 g
	20 % (w/v) SDS	9,25ml
	Methanol	1 l
	H ₂ O	Auf 5 l auffüllen
Hämalaun-Lösung	Hämatoxylin	1 g
	H ₂ O	1 l
	Natriumiodat	0,2 g
	Aluminiumkaliumsulfat-Dodecahydrat	50 g
	Chloralhydrat	50 g
	Zitronensäure	1 g
LB-Medium für Agaroseplatten	Luria Agar	40 g
	H ₂ O	auf 1 l auffüllen
	autoklavieren, auf 60°C abkühlen	
	Kanamycinlösung 50 mg Kanamycin/ ml H ₂ O	1000 µl
	gießen in Petrischalen	
LB-Medium	Luria Broth	20 µg
	H ₂ O	500 ml
	Kanamycinlösung 50 mg Kanamycin/ ml H ₂ O	500 µl

2.1.6 Antikörper

Antikörper	Verwendung	Verdünnung	Hersteller
Anti-Hath1/Math1 AB5692	Western Blot primär	1:200	Millipore, USA
Anti-Hes1, H-140 sc-25392	Western Blot primär	1:200	Santa Cruz, Deutschland
Anti-KLF4 ab26648	Western Blot primär	1:100	Abcam, USA
Anti- β -Aktin AC-15	Western Blot primär	1:5000	Sigma-Aldrich, USA
Anti-Rabbit IgG-HRP	Western Blot sekundär	1:5000	Immuno Research Laboratories, USA
Anti-Mouse IgG-HRP	Western Blot sekundär	1:5000	Immuno Research Laboratories, USA
Anti-Muc1 VU4H5	Immunfärbung primär	1:20	Santa Cruz, Deutschland
Anti-Muc2 NCL-Muc2	Immunfärbung primär	1:200	Leica Biosystems Newcastle Ltd, UK

2.1.7 Synthetische Oligonukleotide

Product	Forward primer (5' → 3')	Reverse primer (5' → 3')
β-Actin	GCCAACCGCGAGAAGATGA	CATCACGATGCCAGTGGTA
Hath1	CGAGAGAGCATCCCGTCTAC	TCCGGGGAATGTAGCAAATA
KLF4	CCCACACAGGTGAGAAACCT	ATGTGTAAGGCGAGGTGGTC
Hes1	CTCTCTCCCTCCGGACTCT	AGGCGCAATCCAATATGAAC
Muc1	AGACGTCAGCGTGAGTGATG	CAGCTGCCCCGTAGTTCTTTC
Muc2	ACCCGCACTATGTCACCTTC	GGGATCGCAGTGGTAGTTGT
HBD2	ATCAGCCATGAGGGTCTTGT	GAGACCACAGGTGCCAATTT
Elafin	CGTGGTGGTGTTCTCATC	CATCACGATGCCAGTGGTA
mβ-Actin	GCTGAGAGGGAAATCGTGCGTG	CCAGGGAGGAAGAGGATGCGG
Math1	AGAGACCTTCCCGTCTACCC	CTGCAAAGTGGGAGTCAGC
mHes1	AGAGGCGAAGGGCAAGAATA	CGGAGGTGCTTCACAGTCAT
mKLF4	AGAGGAGCCCAAGCCAAAGAGG	CCACAGCCGTCCAGTCACAGT
mMuc1	GAAGACCCAGCTCCAATA	GGAGCCTGACCTGAACTTGA
mMuc2	GTGTGGGACCTGACAATGTG	ACAACGAGGTAGGTGCCATC

Die Oligonukleotide wurden von MWG Biotech (Ebersberg) hergestellt und einer HPSF- (High Purity Salt Free) Aufreinigung unterzogen. Die lyophilisierten Oligonukleotide wurden in destilliertem Wasser gelöst und bei -20°C gelagert.

2.1.8 Biologisches Material

2.1.8.1 Mausproben

Das im Rahmen dieser Studie verwendete Gewebe und die mRNA aus dem Maudarm wurde freundlicherweise von Prof. Dr. Manolis Pasparakis (Institut für Genetik, Biozentrum Köln, Universität zu Köln) bereitgestellt.

Für diese Studie wurden Gewebe- und mRNA-Proben der keimfreien (n=7), der konventionellen Mäuse mit der von spezifischen Pathogenen freien (SPF) Darmmikrobiota

(n=4) und der konventionalisierten Mäuse (n=4) verwendet. Die keimfreien Mäuse wurden an der Universität Ulm etabliert und unter sterilen Bedingungen gehalten. Die SPF-Mäuse wurden an der Universität Köln in SPF Einrichtungen aufgezogen. Ein Teil der keimfreien Mäuse wurde konventionalisiert, in dem sie nach Köln transportiert und für 4 Wochen zusammen mit den SPF Mäusen gehalten wurden. Alle Tiere gehörten zu dem Inzuchtstamm C57Bl/6 und waren männlich. Im Alter von 16 Wochen wurden die Tiere getötet und Kolongewebe entnommen.

Des Weiteren wurden Mäuse mit einer spezifischen NEMO-Deletion in intestinalen Epithelzellen (n=6) sowie Wildtyp-Mäuse (n=4) verwendet. Die NEMO-knockout-Mäuse wurden an der Universität Köln in der Arbeitsgruppe um Prof. Dr. Manolis Pasparakis generiert. Dafür wurden Mäuse mit loxP-flankierten NEMO-Allelen mit Villin-Cre-transgenen Mäusen gekreuzt. Eine ausführliche Beschreibung zum Generieren der NEMO-knockout-Mäuse ist in der Arbeit von Nenci et al. (2007) zu finden. Im Alter von 8 Wochen wurden die Tiere getötet und die Gewebeproben aus Dünndarm (Duodenum, Jejunum und Ileum) und Dickdarm (proximaler und distaler Kolon) entnommen.

2.1.8.2 Zellen

Im Rahmen dieser Arbeit wurde für die Experimente die humane kolorektale Karzinomzelllinie LS174T, ein Derivat der LS180 Karzinomzelllinie, verwendet (American Type Culture Collection, Manassas, USA). Diese Zellen weisen einen Becherzell-ähnlichen Phänotyp auf und sezernieren das Muzin Muc2, welches sowohl auf mRNA- als auch auf Protein-Ebene nachweisbar ist (van Klinken et al., 1996). Die LS174T Zellen wurden im Standard-Kulturmedium Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM, Gibco Life Technologies, Deutschland) unter Zusatz von 10% fötalem Kälberserum, 1% nicht-essentiellen Aminosäuren, 1% Penicillin/Streptomycin-Lösung (10 mg/ml) und 1% Natriumpyruvat bei 37°C und 5% CO₂ in Atmosphärenluft kultiviert.

2.1.8.3 Bakterienstämme und ihre Charakteristika

Stamm	Stereotyp	Charakteristika/Deletionen*	Quelle
<i>Escherichia coli</i> Nissle 1917 (DSM 6601)	O6:K5:H1	Probiotischer Stamm	ACS
EcNΔ <i>fliA</i> EcNΔ <i>fliC</i> EcNΔ <i>flgE</i> EcNΔ <i>fim</i> EcNΔ <i>foc</i> EcNΔ <i>csgBA</i>		Sigmafaktor der Flagellumgene* Flagellin* Haken* Typ 1 Pili* F1C Pili* Curli-negativ*	WÜR
<i>Escherichia coli</i> DSM 498	K-12	Apathogener Laborstamm	DSMZ
<i>Lactobacillus fermentum</i>	PZ 1162	Klinisches Isolat	ACS
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	PZ 1138	Probiotischer Stamm	ACS
<i>Bifidobacterium longum</i> (DSM 20219T)	PZ 1323	Klinisches Isolat	ACS
<i>Bifidobacterium breve</i>	Ha6/14c	Klinisches Isolat	ACS
<i>Bifidobacterium adolescentis</i> TSD	PZ 4009	Klinisches Isolat	ACS
<i>Bacteroides vulgatus</i>	DSM 1447	Klinisches Isolat	DSMZ
<i>Escherichia coli</i> DSM 17252 S2 G1: <i>E. coli</i> Genotype 1/2 S2 G2: <i>E. coli</i> Genotype 3/10 S2 G3: <i>E. coli</i> Genotype 4/10	Osp.:H- O 13.:H- Osp.:H-	Probiotischer Stamm Probiotischer Stamm Probiotischer Stamm	SYM

EcN...*E. coli* Nissle 1917

ACS: Ardeypharm collection of strains, Pharma-Zentrale GmbH, Deutschland

WÜR: Universität Würzburg, Deutschland

DSMZ: Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Deutschland

SYM: SymbioPharm GmbH, Deutschland

2.2 Methoden

2.2.1 Aufzucht der Bakterien

Die für diese Arbeit verwendeten Bakterienstämme sind im Kapitel 2.1.8.3 aufgelistet. Die *E. coli* Stämme wurden unter aeroben, und Lactobacillen, Bifidobakterien und *B. vulgatus* unter anaeroben Bedingungen aufgezogen.

Für die Aufzucht der *E. coli* Stämme wurde je eine Perle aus der gefrorenen Vorratssuspension in 10 ml sterilem Tryptic Soy Broth-Medium (TSB) angeimpft und über Nacht bei 37°C geschüttelt. Um die Bakterien in die lineare Wachstumsphase zu bringen, wurden 100 µl der Übernachtskultur in 10 ml frisches TSB-Medium überführt und 4 weitere Stunden geschüttelt.

Die Lactobacillen, Bifidobakterien und *B. vulgatus* wurden zuerst auf Blutagar-Platten ausplattiert und in einem Anaerobiertopf in einem Brutschrank bei 37°C für 48 h inkubiert. Die anaeroben Bedingungen erzeugte ein „Anaero Gen“ Beutel, welcher den Sauerstoff schnell bindet. Mittels „Anaerobier Indicator“ konnte dies überprüft werden. Für die Experimente wurden die Bakterien zum Vermehren in 10 ml TSB-Medium angeimpft und 7 h (*B. vulgatus*) oder über Nacht (Lactobazillen und Bifidobakterien) bei 37°C anaerob inkubiert. Die Bakterien wurden weiter verwendet für Inkubationsversuche mit LS174T Zellen. Um eine konstante Bakteriendichte für die Versuche sicherzustellen, um damit eine bessere Vergleichbarkeit der einzelnen Experimente zu ermöglichen, wurden die Bakterien hitzeinaktiviert. Dafür wurden die Röhrchen mit den angezüchteten Bakterien in TSB in einem 65°C warmen Wasserbad für 1 h inkubiert. Anschließend wurden die Bakterien für 10 min bei 4000 x g abzentrifugiert und unter sterilen Bedingungen mit PBS gewaschen. Nach einer erneuten Zentrifugation wurden die Pellets in 10 ml FCS- und Antibiotika-freiem Versuchsmedium resuspendiert. Anschließend wurde die optische Dichte (OD) bei 595 nm photometrisch bestimmt und mit Versuchsmedium auf 0,3 eingestellt. Dies entspricht einer Zelldichte von 3×10^8 Zellen/ml. Die Bakteriensuspensionen wurden aliquotiert und bei -20°C gelagert.

2.2.2 Kultivierung der Zellen

LS174T Zellen wurden in Flaschen auf 75 cm² kultiviert und zweimal wöchentlich nach dem Erreichen einer Zelldichte von ca. 80 - 90% gesplittet. Dafür wurden diese nach dem Waschen mit Phosphat-gepufferten Kochsalzlösung (PBS) zum Ablösen 5 min mit 0,25% Trypsin/0,02% EDTA bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde das Trypsin mit FCS-haltigem DMEM inaktiviert. Nach Bestimmung der Zellzahl mittels Neubauer Zählkammer wurden die Zellen 1:10 verdünnt und in eine neue Kulturflasche überführt. Für die Experimente wurden Zellen zwischen den Passagen 5 und 35 verwendet. Die Zellen wurden regelmäßig auf eine mögliche Kontamination mit Mykoplasmen mittels „VenorGeM mycoplasma detection kit“ kontrolliert.

Zum Einfrieren wurden die Zellen nach dem Ernten abzentrifugiert und das Pellet im Einfriermedium, bestehend aus 60% DMEM, 20% FCS und 20% Dimethylsulfoxid (DMSO), suspendiert. Die Zellsuspension wurde im Kryoröhrchen für ca. 24 h bei -80°C gelagert und anschließend in flüssigem Stickstoff aufbewahrt. Zum Auftauen wurden die Zellen im Wasserbad bei 37°C angetaut und in Kulturmedium aufgenommen. Nach dem Abzentrifugieren bei 700 rpm für 5 min wurde das Zellpellet in frischem Kulturmedium aufgenommen und in eine Zellkulturflasche überführt.

2.2.3 Zellkulturexperimente

Vor der Behandlung wurden die Zellen in einer 12-Loch-Kulturschale mit einer Dichte von $0,65 \times 10^6$ pro Loch ausgesät und für 28 h kultiviert. Diese Zelldichte ergab eine Konfluenz von 70% zum Beginn des Experiments, was sich in den Vorversuchen für die Fragestellungen dieser Arbeit als optimal herausgestellt hatte. Damit das FCS und die Antibiotika die Ergebnisse der nachfolgenden Experimente nicht verfälschen, wurden die Zellen 12 h vor dem Versuchsbeginn zweimal mit PBS gewaschen und im Versuchsmedium (FCS- und antibiotikafrei) inkubiert.

2.2.4 Inkubation der Zellen mit Bakterien

Zur Behandlung der LS174T Zellen wurde das Kulturmedium aus den Kulturschalen entfernt und 1 ml der Bakteriensuspension bzw. frisches Versuchsmedium als Kontrolle zugefügt. Die Zellen wurden mit *E. coli* Stämmen Symbioflor G1, G2 und G3, *E. coli* K12, *E. coli* Nissle 1917, *Lactobacillus fermentum* und *acidophilus*, *Bifidobacterium longum*, *breve* und *adolescentis* und *Bacteroides vulgatus* für 3, 6, 12 und 24 h inkubiert.

Des Weiteren wurden die Zellen für 3 h mit dem *E. coli* Nissle 1917 Wildtyp und den *E. coli* Nissle 1917 Deletionsmutanten EcNΔ*fliA*, EcNΔ*fliC*, EcNΔ*flgE*, EcNΔ*fim*, EcNΔ*foc* sowie EcNΔ*csgBA* (mit freundlicher Genehmigung von T. Ölschläger, Institut für Molekulare Infektionsbiologie, Universität Würzburg) inkubiert.

Zum Abstoppen des Experimentes wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen und 5 min in RLT-Puffer + 1% β-Mercaptoethanol lysiert. Das Lysat wurde mit den QIAshreddern (Qiagen) 2 min bei max. Drehzahl homogenisiert und anschließend bei -80°C gelagert.

2.2.5 Behandlung der Zellen mit Blockern

Um die Rolle von bestimmten Signalkaskaden bei den *E. coli* Nissle 1917 bedingten Effekten zu untersuchen, wurden LS174T Zellen mit spezifischen Blockern mit und ohne Zusatz von *E. coli* Nissle 1917 behandelt. Die Notch-Signalkaskade wurde mittels des γ-Secretase-Inhibitors Dibenazepin (DBZ) geblockt. Des Weiteren wurde Anti-hTLR5-IgA, ein chimärischer monoklonaler Antikörper, der spezifisch gegen humanes TLR5 gerichtet ist, verwendet. Zur Analyse der NFκB-Signalkaskade wurden die zwei NFκB-Blocker Helenalin und Bay 11-7082 eingesetzt. Helenalin, ein Wirkstoff aus der Pflanze *Arnica chamissonis*, alkyliert selektiv die p65-Untereinheit des NFκB-Transkriptionsfaktors und verhindert so dessen Bindung an die DNA (Lyss et al., 1998). Bay 11-7082 ist ein synthetischer IKK-Inhibitor, welcher die Phosphorylierung von IκB und damit die Freisetzung des NFκB-Transkriptionsfaktors verhindert (Hansson et al., 2005).

Die Zellen wurden mit jeweils einem der Blocker, *E. coli* Nissle 1917 und einer Kombination aus Blocker und *E. coli* Nissle 1917 behandelt. Als Kontrolle diente das Versuchsmedium, welchem 0,1% DMSO zugefügt wurde, wenn die Stocklösungen der Blocker DMSO enthielten. Auch die Blocker wurden für die Experimente im Versuchsmedium so verdünnt,

dass die Konzentration von DMSO 0,1% betrug. Für die Blocker wurden verschiedene Versuchsbedingungen verwendet, welche durch Vorversuche bestimmt bzw. der Literatur entnommen wurden. Der Versuchsaufbau für alle verwendeten Blocker ist in Tabelle 1 dargestellt.

Tabelle 1: Inkubation von LS174T Zellen mit Inhibitoren der Notch-Signalkaskade (DBZ), des TLR5 (PAb hTLR5) und der NFkB-Signalkaskade (Helenalin und Bay 11-7082) in Kombination mit *E. coli* Nissle 1917 (EcN).

Blocker	Vorinkubation		Stimulation	
DBZ anti-Notch		0 h	Versuchsmedium / 0,1% DMSO	3, 6, 12 und 24 h
			DBZ 1 µM	
			EcN / 0,1% DMSO	
			EcN / DBZ 1 µM	
PAb hTLR5 anti-TLR5	Versuchsmedium	2 h	Versuchsmedium	3 h
	PAb hTLR5 7 µg/ml		PAb hTLR5 7 µg/ml	
	Versuchsmedium		EcN	
	PAb hTLR5 7 µg/ml		EcN / PAb hTLR5 7 µg/ml	
Helenalin anti-NFkB	Versuchsmedium / 0,1% DMSO	1 h	Versuchsmedium	3 h
	Helenalin 20 µM		Versuchsmedium	
	Versuchsmedium / 0,1% DMSO		EcN	
	Helenalin 20 µM		EcN	
Bay 11-7082 anti-NFkB	Versuchsmedium / 0,1% DMSO	1 h	Versuchsmedium / 0,1% DMSO	3 h
	Bay 11-7082 10 µM		Bay 11-7082 10 µM	
	Versuchsmedium / 0,1% DMSO		EcN / 0,1% DMSO	
	Bay 11-7082 10 µM		EcN / Bay 11-7082 10 µM	

2.2.6 Analyse der mRNA- Expression

2.2.6.1 Isolierung der RNA und cDNA-Synthese

Zur Gewinnung der RNA wurde das RNeasy Mini Kit von Qiagen nach Herstellerprotokoll verwendet. Nach dem Trocknen wurde die RNA in 30 µl nukleasefreiem Wasser aufgenommen und zum Lösen für 10 min bei 55°C in einem Heizblock inkubiert.

Anschließend wurde die Konzentration mit einem NanoDrop Spektrophotometer bei einer Wellenlänge von 260 nm bestimmt. 1 µg der Gesamt-RNA wurde mit Oligo- (dT)-Primer und AMP-reverse Transkriptase zur cDNA-Synthese verwendet. Dazu wurde 1 µg der RNA mit nukleasefreiem Wasser auf ein Endvolumen von 9,75 µl verdünnt und im Thermocycler zur Linearisierung 10 min auf 70°C erhitzt. Anschließend wurden 10,25 µl des Mastermixes zugegeben, welcher nach dem Herstellerprotokoll vorbereitet wurde. Zur cDNA-Synthese wurden die Proben für 15 min bei 42°C und 5 min bei 95°C im Thermocycler inkubiert. Anschließend wurde die cDNA 5 min auf Eis abgekühlt und mit nukleasefreiem Wasser auf ein Endvolumen von 100 µl aufgefüllt. Bis zur Analyse wurde die cDNA bei –20°C gelagert.

2.2.6.2 Konstruktion der Plasmide

Für die absolute Quantifizierung der cDNA-Proben wurde eine Standardkurve von Plasmiden, welche die jeweiligen cDNA-Produkte enthielten, verwendet. Zur Herstellung der Plasmide wurden cDNA-Produkte mit den im Kapitel 2.1.7 angegebenen Primern und HotStarTaq DNA-Polymerase nach dem Herstellerprotokoll amplifiziert. Anschließend wurde das cDNA-Produkt mittels QIAquick PCR Purifikation Kit von Qiagen gereinigt und in einen PCR2.1-TOPO-Vektor durch eine TA-Ligation nach dem Protokoll des TOPO TA Cloning Kits kloniert. Es folgte eine Transformation des Plasmids in TOP10 *E. coli* Zellen, welche dann auf LB-Agaroseplatten ausplattiert wurden. Nach einer Übernacht-Inkubation wurden die rekombinanten TOP10 *E. coli*-Kolonien selektiert. Dies geschah zum einen dadurch, dass die Platten zuvor mit 50 µl Ampicillin (50 µg/ml) versetzt wurden. So wurde gewährleistet, dass nur Bakterien hochwachsen, welche das Plasmid aufgenommen hatten, da dieses eine Ampicillin-Resistenz trägt. Zum anderen wurden die Agaroseplatten mit 40 µl X-Gal-Lösung (40 mg in N,N-Dimethylformamid) bestrichen. Dies ermöglichte die TOP10 *E. coli* zu erkennen, welche einen Vektor mit kloniertem cDNA-Produkt aufgenommen hatten. Durch

die Religation des leeren Vektors war die β -Galaktosidase aktiv und konnte X-Gal umsetzen, was zur blauen Färbung der Kolonie führte. Durch den Einbau des cDNA-Produktes wurde die β -Galaktosidase-Aktivität unterbunden und die Kolonie blieb weiß. Mehrere weiße Kolonien wurden gepickt und zum Vermehren in je 5 ml LB-Ampicillin-Medium über Nacht bei 37°C geschüttelt. Anschließend wurden die Plasmide mittels QIAprep Spin Miniprep Kit von Qiagen nach Herstellerprotokoll isoliert, mit nukleasefreiem Wasser eluiert und die Konzentration photometrisch bestimmt.

Zum Überprüfen, ob die Plasmide das gewünschte Produkt enthalten, wurde zunächst die Größe des Inserts bestimmt. Dazu mussten die Plasmide mit dem Restriktionsenzym EcoRI nach dem Protokoll des Herstellers verdaut werden. Anschließend wurde die Größe der verdauten DNA mittels Gelelektrophorese in einem 1%igen Agarosegel in 1xTAE und einem Größenstandard bestimmt. Um die Sequenz des Inserts zu überprüfen, wurde die Plasmid-DNA mit der korrekten Größe anschließend sequenziert. Dafür wurden die Proben mit dem BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing-Kit wie im Herstellerprotokoll angegeben vorbereitet und mittels des ABI PrismTM 310 Sequencers sequenziert. Das Plasmid mit dem gewünschten DNA-Insert wurde zu einer Standardkurve von 1 bis 10⁻⁷ ng verdünnt und im LightCycler480 zusammen mit den cDNA-Proben gemessen.

2.2.6.3 Real-Time-PCR

Im Anschluß an die cDNA-Synthese wurde die mRNA-Expression mittels quantitativer Real-Time-PCR mit Hilfe des LightCyclers 480 analysiert. Die Quantifizierung erfolgte über den fluoreszierenden DNA-Farbstoff SYBR Green I, welcher bei der Bindung an doppelsträngige DNA seine Fluoreszenzintensität um das Hundertfache steigert. Während der PCR nimmt die Fluoreszenz proportional mit der Produktmenge zu und ermöglicht dadurch quantitative Aussagen über die Ausgangskonzentration der Zielsequenz.

Der SYBR Green I Mastermix wurde nach den Angaben des Herstellers zusammengestellt. Als Template wurde cDNA, welche 10 ng RNA entsprach, eingesetzt. Die verwendeten Primer wurden mit DEPC-Wasser auf 100 pmol/ μ l eingestellt. Für die Real-Time-PCR wurde die Primerstammlösung im Verhältnis 1:10 eingesetzt. Die für die jeweiligen Primer verwendeten PCR-Programme sind in Tabelle 2 zusammengestellt. Im Anschluss an die PCR wurde eine Schmelzkurve der PCR-Produkte aufgezeichnet. Anhand der Schmelzkurve, die für jedes PCR-Produkt spezifisch ist, lässt sich die Anwesenheit unspezifischer Produkte

überprüfen. Dabei wurden die Proben für 15 s auf eine Temperatur zwischen 56 und 65°C abgekühlt und anschließend mit einem Gradienten von 0.20°C/s auf 95°C erhitzt, während dessen die Fluoreszenzsignale der Proben kontinuierlich gemessen wurden. Zur Quantifizierung der cDNA-Proben wurde eine Standardkurve eines Plasmids mit dem entsprechenden Insert mitanalysiert. Die LightCycler480 Software erstellte aus den Messdaten eine Standardkurve. Mit Hilfe dieser konnten die unbekannten Konzentrationen der cDNA-Proben berechnet werden. Die aufgezeichneten Daten wurden anschließend mit der LightCycler Data Analysis Software 3.5 ausgewertet.

Tabelle 2: Programme für die real-time-PCR Messungen

Gen	Denaturierung	Amplifikation 45 Zyklen	Schmelzkurve
Hath1, Muc1, Muc2, HBD2, Elafin, m β -Aktin, mHes1, mKLF4, mMuc1, mMuc2	96°C 5 min	96°C 10 s 62°C 5 s 72°C 10 s	95°C 1 s 60°C 15 s 95°C ∞
Hes1, Math1	96°C 5 min	96°C 10 s 60°C 5 s 72°C 10 s	95°C 1 s 58°C 15 s 95°C ∞
KLF4	96°C 5 min	96°C 10 s 58°C 5 s 72°C 10 s	95°C 1 s 56°C 15 s 95°C ∞
β -Aktin	95°C 10 min	95°C 15 s 60°C 5 s 72°C 10 s	95°C 1 s 65°C 15 s 95°C ∞

m=Maus

2.2.7 Analyse der Proteinexpression

2.2.7.1 Proteinisolierung

Zum Isolieren des Gesamtproteins aus der Zellkultur wurden die Zellen nach dem Abnehmen des Kulturmediums mit vorgekühltem PBS versetzt und abgeschabt. Anschließend wurden die Zellen bei 4°C für 5 min zentrifugiert und das Pellet im frischen PBS resuspendiert. Nach dem erneuten Zentrifugationsschritt wurde das Pellet im flüssigen Stickstoff schockgefroren. Zum Lysieren wurde das Pellet kurz angetaut und je nach Pelletgröße mit 100 bis 200 µl kaltem Lysepuffer I (Kapitel 2.1.5) versetzt. Anschließend wurden die Zellen mittels Sonikator mit der Powereinstellung MS 72/D für 20 s aufgeschlossen. Es folgte eine Zentrifugation über 15 min bei 13000 rpm. Der Überstand wurde in ein neues Eppendorfgefäß überführt und das Pellet verworfen.

Das Gesamtprotein aus Maudarmgewebe wurde mit Hilfe des Fast Prep 24 Homogenisationssystems gewonnen. Dafür wurden die Gewebestücke in Röhrchen gegeben, die zur Hälfte mit Kügelchen (Lysing Matrix Beads) befüllt waren, und mit dem Lysepuffer I versetzt. Die Homogenisation erfolgte in dem Fast Prep 24 Instrument bei 5 m/s, dauerte 30 s und wurde 3mal wiederholt. Anschließend wurden die Proben für 90 min auf Eis inkubiert, wobei diese alle 20 min gevortext wurden. Es folgte eine Zentrifugation bei 13200 g und 4°C für 20 min. Der gewonnene Überstand wurde in ein neues Eppendorfgefäß überführt und bei -80°C gelagert.

Die Proteinkonzentration wurde mit Hilfe eines, auf Bicinchoninsäure basierenden, Assays nach Smith (Smith et al., 1985) bestimmt. Dieser beruht auf der Biuret-Reaktion, bei welcher Proteine im alkalischen Milieu Cu^{2+} -Ionen zu Cu^{+} -Ionen reduzieren. Diese bilden mit Bicinchoninsäure einen violetten Farbkomplex, welcher bei 562 nm sein Absorptionsmaximum besitzt. Zur Bestimmung wurden 10 µl des 1:10 verdünnten Lysates im Duplikat auf die 96-well-Platte aufgetragen. Als Standard diente eine Konzentrationsreihe von 0 bis 1000 µg/ml Rinderserumalbumin (Bovines Serumalbumin, BSA). Es wurden 200 µl des BCA-Reagenz aus dem BCA-Kit zu den Proben gegeben und 1 h bei 37°C inkubiert. Die Messung erfolgte am Victor 1420 Photometer.

2.2.7.2 Western Blot

Für die Proteinanalyse wurden 40 µg des Gesamtproteins aus Maudarmgewebe bzw. 20 µg aus Zelllysaten mit SDS-Ladepuffer versetzt und 5 min bei 95°C inkubiert. Alle verwendeten Puffer und Gele sind im Kapitel 2.1.5 beschrieben. Die Auftrennung der Proteine erfolgte mittels SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese (SDS-PAGE). Dafür wurde ein Polyacrylamidgel hergestellt und in einem Laufapparat platziert. Nachdem Beladen des Gels mit Proteinproben und Auffüllen des Laufapparats mit 1x Laufpuffer wurde das Protein über Nacht bei 6 mA bei einem Gel bzw. 12 mA bei zwei Gelen aufgetrennt. Als Größenstandard diente dabei der Kaleidoscope Standard. Anschließend wurden die aufgetrennten Proteine durch Semi-Dry-Blotten auf eine Nitrocellulosemembran übertragen. Dafür wurde ein Sandwich aus drei Lagen an Filterpapieren, einer Nitrocellulosemembran, dem Polyacrylamidgel und wieder drei Lagen an Filterpapieren hergestellt. Alle Bestandteile wurden zuvor im Transferpuffer eingelegt. Das Blotten wurde mit einem „Fastblot B43“ Apparat für 17 min bei 350 mA bei einer Membran und 400 mA bei zwei Membranen durchgeführt.

Nach dem Transfer wurde die Membran einer reversiblen Ponceaufärbung unterzogen, um das Gelingen des Blottvorganges zu überprüfen. Anschließend wurde die Membran 1 h mit 5% Milchpulver in 1xTBS-T bei Raumtemperatur geblockt. Alle Inkubations- und Waschschrirte wurden auf einem Wippschüttler durchgeföhrt, um eine gute Verteilung der Lösungen auf der Membran zu gewährleisten. Die verwendeten primären und sekundären Antikörper, sowie die verwendeten Verdünnungen sind im Kapitel 2.1.6 angegeben. Für den Western Blot wurden alle Antikörper in 5% Milchpulver in 1xTBS-T verdünnt. Nach dem Blocken wurde die Membran mit einem Primärantikörper über Nacht bei 4°C inkubiert. Nach drei Waschschrirten mit TBS-T für je 20 min wurde die Membran 1 h bei Raumtemperatur mit dem sekundären Antikörper inkubiert und erneut gewaschen.

Zur Visualisierung der Proteinbanden auf der Membran, wurde diese zunächst 5 min in der Entwicklungslösung von Pierce im Dunkeln inkubiert. Die dabei entstehende Chemilumineszenzreaktion wurde mit Hilfe der geköhltten CCD-Kamera Las1000 detektiert und die entsprechenden Proteinbanden visualisiert. Die Analyse der Ergebnisse erfolgte unter Verwendung des 2D-Densitometrie-Programms Aida 2.31., wobei die Signalintensität jeder einzelner Bande erfasst wurde. Die dabei gewonnenen Werte wurden mit Hilfe des Programms GraphPad Prism statistisch ausgewertet.

2.2.7.3 Dephosphorylierung mit lambda Proteinphosphatase

LS174T Zellen wurden 6h mit EcN inkubiert und anschließend unter Verwendung des Lysepuffers II (siehe Kapitel 2.1.5) lysiert. Um zu analysieren, ob das Hes1-Protein nach der Behandlung mit EcN phosphoryliert wird, wurden die Zelllysate mit lambda Proteinphosphatase (Lambda PP) behandelt. Die Reaktionslösung enthielt 40 µg Gesamtprotein, 1xNEBuffer, 2 mM MnCl₂ mit 0, 500, 1000 und 5000 Einheiten der Lambda PP. Alle Reagenzien wurden von BioLabs zusammen mit Lambda PP geliefert. Die Proben wurden 30 min bei 30°C inkubiert und anschließend mittels Western Blot analysiert.

2.2.7.4 Zytologische und histologische Färbungen

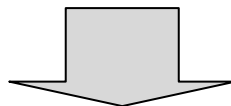
Für die Immunfärbung von Muc1- und Muc2-Protein in LS174T Zellen wurden diese auf 2-well Chamber Slides, einem miniaturisierten Kultivierungsgefäß, das an einem Mikroskop-Objektträger befestigt war, in einer Dichte von $0,65 \times 10^6$ pro Loch ausgesät. Nach der Inkubation mit EcN für 6 h wurden die Zellen mit PBS gewaschen und in 100%igem Ethanol bei -20°C für 10 min fixiert. Anschließend wurden die Zellen 2mal für je 1 min mit TBS-T gewaschen und mit 100 µl Muc1- bzw. Muc2-Antikörper-Lösung (Kapitel 2.1.6) versetzt. Nach dem Aufsetzen eines Deckglases wurden die Zellen 1 h in einer feuchten Kammer inkubiert. Es folgten 3 Waschschrte mit TBS-T für je 3 min, um den überschüssigen Antikörper zu entfernen. Anschließend wurden 2 Tropfen des sekundären Antikörpers (Dako REAL Envision HRP Rabbit/Mouse) auf die Zellen gegeben, welche dann mit Deckgläser bedeckt, in einer feuchten Kammer 30 min lang inkubiert wurden. Danach wurden die Objektträger wieder 3-mal je 3 min mit TBS-T gewaschen und mit je 100 µl der DAB-Färbelösung (3,3'-Diaminobenzidin/Chromogen-Lösung, Dako Envision Kit) versetzt. Die abgedeckten Objektträger wurden 10 min in einer feuchten Kammer inkubiert. Nach der Inkubation wurde die DAB-Färbelösung 3 min unter fließendem Wasser von den Objektträgern abgewaschen und die Zellkerne mittels Hämalaun-Lösung (Kapitel 2.1.5) 10 sec gefärbt. Anschließend wurden die Objektträger 3 min unter fließendem Wasser gespült. Zum Entwässern der gefärbten Zellen wurden die Objektträger für je 3 min im 70%igen, 96%igen und 100%igen Ethanol inkubiert. Es folgte die Behandlung mit Neoclear-Lösung für 3 min, um den Alkohol zu verdrängen, wonach die Zellen mit 2 Tropfen Eindeckmedium (DePeX Gurr) pro Objektträger eingedeckt wurden.

Die Alcian Blue Färbung sowie die immunhistologische Färbung des Muc2-Proteins im Kolon der keimfreien, SPF und konventionalisierten Mäuse wurde freundlicherweise von Dr. Katerina Vlantis (Institut für Genetik, Biozentrum Köln, Universität zu Köln) nach Standardprotokollen angefertigt.

Die Auswertung der Färbungen und Aufnahme der Fotos erfolgte mittels Leica DM 4000 B Mikroskop und der Leica Application Suite Software.

Vorgehen im Überblick

Einfluss der intestinalen Bakterien auf die Expression von		
Differenzierungsfaktoren Hes1, Hath1, KLF4	Muzinen Muc1 und Muc2	antimikrobiellen Peptiden Elafin und HBD2
<i>in vitro</i> : in LS174T Zellen, inkubiert mit verschiedenen intestinalen Keimen		
<i>in vivo</i> : im keimfreien, SPF besiedelten vs. konventionalisierten Maudarm		



EcN-vermittelte Regulation		Rolle der NFκB-Signalkaskade
Expression von Hes1, Hath1, KLF4, Muc1, Muc2, Elafin und HBD2 in LS174T Zellen inkubiert mit verschiedenen EcN-Deletionsmutanten	Expression von Hes1, Hath1, KLF4, Muc1, Muc2, Elafin und HBD2 in LS174T Zellen nach NFκB- Blockade mit und ohne EcN-Behandlung	Expression von Hes1, Hath1, KLF4, Muc1, Muc2 im NFκB-defizienten Maudarm
Rolle von EcN-Flagellin		

3. Ergebnisse

3.1 Der Einfluss intestinaler Bakterien auf die Expression der Differenzierungsfaktoren Hes1, Hath1 und KLF4

In Studien mit keimfreien und gnotobiotischen Tieren wurde bereits beobachtet, dass die Darmmikrobiota nicht nur an der Ausreifung des intestinalen Immunsystems beteiligt ist, sondern auch die Morphologie des Darmepithels beeinflusst (Shirkey et al., 2006; Thompson and Trexler, 1971). Außerdem sind die intestinalen Mikroorganismen an der Entstehung und dem Verlauf verschiedener Darmerkrankungen wie CED und Darmkrebs beteiligt (Marteau and Chaput, 2011; Sun, 2010). Während der Differenzierung der intestinalen Vorläuferzellen zu den verschiedenen Epithelzelltypen spielen unter anderem die Differenzierungsfaktoren Hes1, Hath1 und KLF4 eine entscheidende Rolle (van der Flier and Clevers, 2009). Diese sind ebenfalls mit CED (Gersemann et al., 2009; Zheng et al., 2011) und der Entstehung intestinaler Tumoren assoziiert (Choi et al., 2006; Kazanjian and Shroyer, 2011).

Im ersten Teil der Arbeit sollte untersucht werden, ob Darmbakterien die Expression von Hes1, Hath1 und KLF4 beeinflussen können. Dafür wurde zunächst die Zelllinie LS174T, welche von einem Kolonadenokarzinom stammte, mit 11 intestinalen, hitzeinaktivierten Keimen (Kapitel 2.1.8.3) inkubiert. Anschließend wurde die Expression von Hes1, Hath1 und KLF4 mittels RT-PCR und Western Blot ermittelt und im Vergleich zu unbehandelten Zellen statistisch analysiert. Des Weiteren wurde die Expression von mHes1 (m=Maus), Math1 (Maus-homolog vom humanen Hath1) und mKLF4 im Kolon der keimfreien, besiedelten und konventionalisierten Mäuse auf mRNA und Proteinebene verglichen.

3.1.1 Effekt der einzelnen Bakterien auf die Expression von Hes1, Hath1 und KLF4 *in vitro*

Die Expression des Hes1-Gens wurde im *in vitro* Experiment durch Inkubation mit mehreren Bakterienstämmen merklich verändert (Abb. 4), wobei die Inkubationen mit dem probiotischen *E. coli* Nissle 1917 (EcN) und dem Laborstamm *E. coli* K-12 (EcK12) die stärksten Effekte hatten. Beide *E. coli*-Stämme reprimierten signifikant die Hes1-Expression nach 3h Inkubation um mehr als die Hälfte (EcK12: 0,42-fach; EcN 1917: 0,38-fach). Im Verlauf der Inkubation wurde die Repression von Hes1-mRNA schwächer, bis nach 24h keine signifikanten Unterschiede zur unbehandelten Kontrolle mehr festzustellen waren. Auch der probiotische *E. coli* Symbioflor G2 regulierte die Hes1-mRNA-Expression nach einem

ähnlichen zeitabhängigen Muster deutlich, wenn auch nicht so stark wie EcK12 und EcN, herunter. Die zwei anderen Symbioflor Stämme G1 und G3 hatten dagegen einen eher schwachen repressorischen Effekt auf die Hes1-Expression. Die Inkubation mit *L. fermentum* und *L. acidophilus* führte nach 3h erst zu einer leichten Induktion und anschließend zu einer leichten Hemmung der Hes1-mRNA Expression, wobei die Effekte nicht ganz eindeutig und nur nach 6h Behandlung mit *L. acidophilus* signifikant waren. Die untersuchten *Bifidobacteria* Stämme sowie *B. vulgatus* hatten im Rahmen dieses Experimentes keinen Einfluss auf die mRNA-Synthese von Hes1.

Die Hath1-mRNA-Expression wurde ebenfalls durch die Behandlung mit den *E. coli*-Stämmen EcK12 und EcN deutlich verändert (Abb. 4). Die mRNA-Level wurden hier am stärksten nach 3h herunterreguliert (EcK12: 0,69-fach; EcN 1917: 0,74-fach). Aber auch nach 6, 12 und 24h Inkubation mit EcK12 und EcN blieb die Hath1-Expression in den behandelten Zellen niedriger als in den Kontrollen. In den mit Symbioflor G2 behandelten LS174T Zellen war die Hath1-Expression zu allen vier Zeitpunkten leicht, jedoch nicht signifikant erniedrigt. Die beiden *Lactobacillus* Stämme scheinen auch hier ab 6h Inkubation einen leichten, aber nicht signifikanten, repressiven Effekt auf die Hath1-mRNA-Expression zu haben. Die repressive Wirkung der Behandlung mit den drei untersuchten *Bifidobacteria* auf die Hath1-Expression ist ebenfalls nicht eindeutig und eher schwach. Dabei zeigt die Inkubation mit jedem der 11 Keime eine Tendenz, die Expression von Hath1 zumindest nach 24h leicht zu reprimieren.

Wenn man den zeitlichen Verlauf der KLF4-mRNA-Expression nach Inkubation mit den untersuchten Keimen betrachtet, lässt sich ein zeitlich abhängiges Muster erkennen (Abb. 4). Die Mehrzahl der 11 untersuchten Keime scheinen die KLF4-mRNA-Expression nach 3h zunächst leicht zu induzieren, wobei sich der Effekt mit der Zeit in eine Repression umkehrt. So führte auch die Behandlung mit EcK12 und EcN zunächst zu einem Anstieg der KLF4-Expression, welche dann aber sank und nach 12h (EcK12: 0,81-fach; EcN: 0,83-fach) und nach 24h (EcN: 0,82-fach) signifikant erniedrigt war. Am deutlichsten ist die zeitliche Veränderung des KLF4-mRNA-Levels nach der Inkubation mit *B. vulgatus*. Die Behandlung von LS174T Zellen mit *L. fermentum* induzierte leicht, aber signifikant die KLF4-Expression nach 3 und 6h wobei nach 12 und 24h das mRNA-Level leicht unter den Kontrollwert sank. Auch die Inkubation mit *B. adolescentis* nach 24h und mit *L. acidophilus* nach 12h führte zu einer signifikanten Erniedrigung des KLF4-mRNA-Levels.

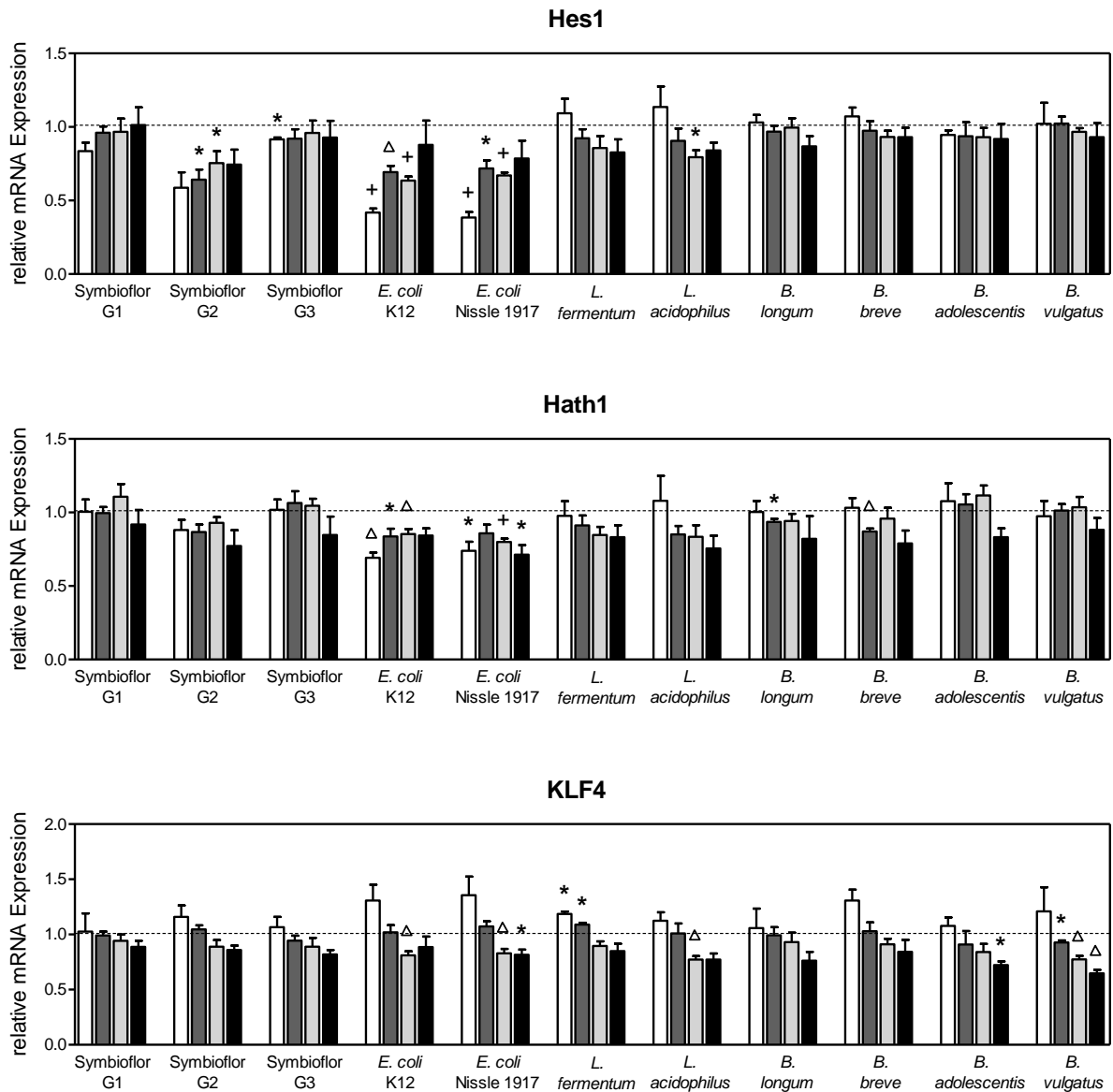


Abbildung 4 : RT-PCR-Analyse der Hes1-, Hath1- und KLF4-mRNA-Expression in LS174T Zellen nach Inkubation mit verschiedenen, hitzeinaktivierten Bakterienstämmen für 3 (weiße Balken), 6 (dunkelgraue Balken), 12 (hellgraue Balken) und 24 (schwarze Balken) Stunden. Die unbehandelten Kontrollen wurden auf 1 gesetzt und sind durch die gestrichelte Linie dargestellt. Alle Experimente wurden mindestens 3-mal wiederholt und auf die Expression von β -Aktin normalisiert. Graphisch dargestellt wurde jeweils der Mittelwert \pm SEM. $p < 0,05$ (*), $p < 0,01$ (Δ) und $p < 0,001$ (+)

Zusammenfassend ist festzuhalten, dass die mRNA-Expression von Hes1, Hath1 und KLF4 von einigen der untersuchten Keime reguliert wird. Dabei fielen insbesondere die beiden *E. coli*-Stämme EcK12 und EcN auf, welche alle drei Differenzierungsfaktoren signifikant herunterregulierten.

EcN ist ein probiotischer Stamm und wird bei einigen intestinalen Erkrankungen angewendet sowie weiterhin intensiv zu seiner medizinischen Relevanz erforscht. Viele Studien zeigten eine positive Wirkung des probiotischen Keims auf den Verlauf verschiedener intestinaler Erkrankungen (Henker et al., 2007; Kruis et al., 2004, 2012; Matthes et al., 2010). Im Gegensatz dazu ist EcK12 ein Laborstamm, welcher genetisch so modifiziert wurde, dass er nur unter bestimmten Laborbedingungen überleben kann und nicht imstande ist, einen Gastrointestinaltrakt zu kolonialisieren. Aus diesem Grund und angesichts der klinischen Bedeutung habe ich mich bei den folgenden Experimenten auf den probiotischen Keim EcN konzentriert.

Für die Proteinanalyse wurden LS174T Zellen für 3, 6, 12 und 24h mit hitzeinaktivierten EcN behandelt, Western Blot Analysen durchgeführt und anschließend die Proteinbanden densitometrisch ausgewertet. In Abbildung 5 sind jeweils repräsentative Blots dargestellt, wobei die Zeitpunkte mit den stärksten EcN-Effekten abgebildet sind (Hes1 nach 12h, Hath1 nach 6h und KLF4 nach 24h Inkubation mit EcN).

Die Behandlung mit EcN führte zum Erscheinen einer zweiten Hes1-positiven, ca. 2 bis 3kDa größeren Bande (Abb. 5A). Dies könnte dafür sprechen, dass die Stimulation mit EcN nicht nur eine verminderte mRNA-Expression, sondern auch eine posttranslationale Modifikation von Hes1 zur Folge hat. In einer Studie berichtete Ström *et al.*, dass Hes1 an seiner DNA-Bindungsdomäne durch die Proteinkinase C phosphoryliert werden kann, wodurch die Bindung an die DNA und somit auch die transkriptionelle Repressorfunktion von Hes1 geblockt wird (Ström et al., 1997). Auf Basis dieser Arbeit entstand die Hypothese, dass Hes1 durch die Behandlung mit EcN phosphoryliert und damit eventuell auch seine Funktion verändert werden könnte. Um dieser Fragestellung nachzugehen, wurden LS174T Zellen für 12h mit EcN inkubiert und die Zelllysate mit lambda Proteinphosphatase behandelt, welche Serin-, Threonin- und Tyrosinreste dephosphoryliert. Im Rahmen dieser Arbeit konnte keine Phosphorylierung von Hes1 durch EcN nachgewiesen werden. Beide durchgeführten Dephosphorylierungsversuche zeigten die Hes1-Doppelbande nach der Behandlung der Zelllysate mit lambda Proteinphosphatase genauso stark wie in den unbehandelten Proben (Abb. 6). Zur densitometrischen Analyse wurde die Bande des niedrigeren Molekulargewichts, welche auf der Höhe der unbehandelten Kontrolle lag, verwendet. Die statistische Analyse ergab einen niedrigeren Hes1-Proteingehalt in den mit EcN behandelten LS174T Zellen verglichen mit den unbehandelten Kontrollen (0,68-fach, Abb. 5A). Wenn man

bei der densitometrischen Analyse beide Hes1-Doppelbanden einbezogen, war dieser in der Proteinmenge nivelliert (Daten nicht gezeigt).

Die Menge an Hath1-Protein war nach 6h EcN-Behandlung signifikant niedriger (0,74-fach) im Vergleich zum Proteingehalt von unbehandelten Zellen (Abb. 5B). Die Expression von KLF4-Protein scheint nach 24h ebenfalls reduziert zu sein, auch wenn sich keine statistische Signifikanz ergab (0,66-fach; Abb. 5C).

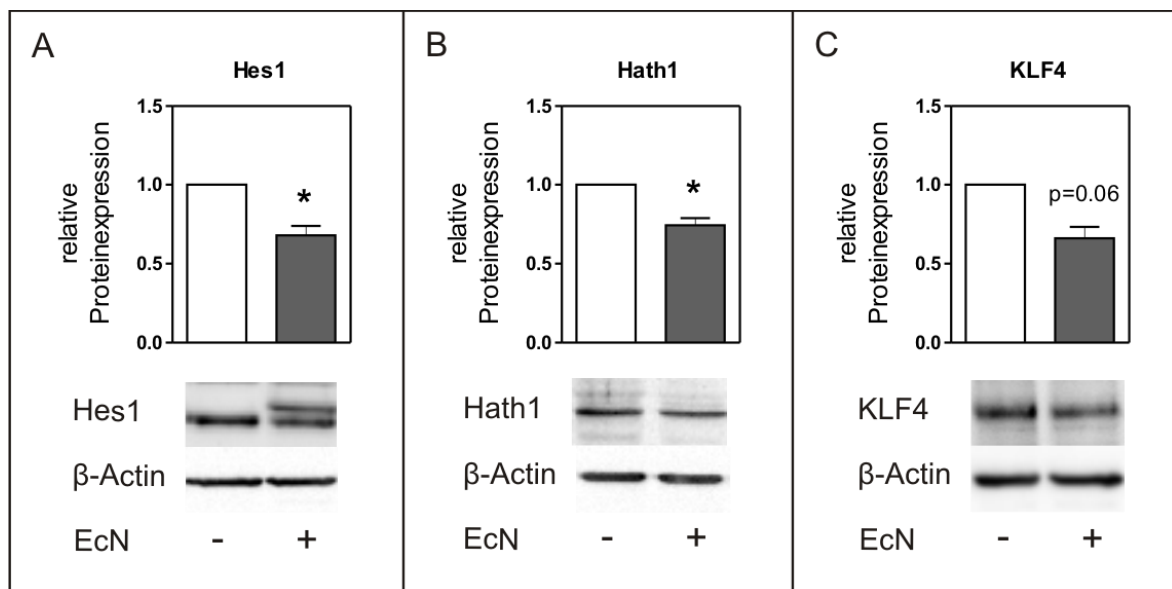


Abbildung 5: Western Blot Analyse der Hes1-(A), Hath1-(B) und KLF4-(C) Expression in LS174T Zellen nach Inkubation mit hitzeinaktivierten *E. coli* Nissle 1917 (EcN). Zur densitometrischen Auswertung des Hes1-Proteins wurde die untere Hes1-Proteinbande verwendet. Abgebildet sind die stärksten Effekte der EcN-Inkubation nach 12h (Hes1), 6h (Hath1) und 24h (KLF4). Alle Experimente wurden mindestens 3-mal wiederholt. Graphisch dargestellt wurde jeweils der Mittelwert \pm SEM. $p < 0,05$ (*)

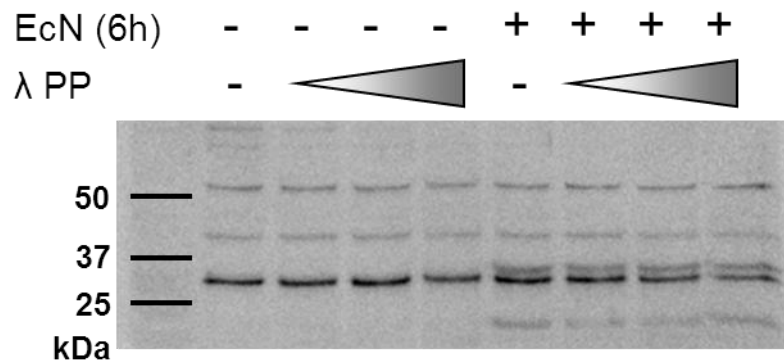


Abbildung 6: Dephosphorylierung des Hes1-Proteins. LS174T Zellen wurden mit hitzeinaktivierten *E. coli* Nissle 1917 (EcN) 6h inkubiert. Die Zelllysate wurden mit 500, 1000 und 5000U der lambda Proteinphosphatase (λ PP) behandelt und mittels Western Blot analysiert.

3.1.2 Der Effekt der Mikrobiota in ihrer Gesamtheit auf die Expression von Hes1, Hath1 und KLF4 *in vivo*

Als nächstes wurde der Einfluss der gesamten Darmmikrobiota auf die Expression der intestinalen Differenzierungsfaktoren mHes1 (m=Maus), Math1 (Maus-homolog zu Hath1) und mKLF4 im distalen Kolon *in vivo* untersucht. Dafür wurden keimfreie Mäuse mit einem sterilen Darmtrakt verwendet. Als Vergleich dienten SPF Mäuse, welche eine ganz normale kommensale Darmmikrobiota besaßen, und als dritte Gruppe wurden Mäuse untersucht, die zwar keimfrei aufgezogen wurden, dann aber für vier Wochen zusammen mit SPF Mäusen gehalten wurden, wobei der anfangs sterile Maudarm mit intestinalen Keimen besiedelt wurde. Diesen Vorgang nennt man Konventionalisierung.

Alle drei untersuchten Faktoren wurden durch die Präsenz von intestinalen Darmmikrobiota im Maudarm auf mRNA-Ebene herunterreguliert (Abb. 7A bis C). Dabei war die Hes1-Expression in den SPF Mäusen im Vergleich zu den keimfreien Mäusen 0,77-fach erniedrigt. Auch im Kolon der konventionalisierten Mäuse war der mHes1-mRNA-Level signifikant niedriger im Vergleich zu dem der keimfreien Mäuse (0,51-fach) und damit noch mehr herunterreguliert als in den SPF Mäusen. Die Math1-mRNA wurde im Kolon der SPF Mäuse (0,58-fach) und der konventionalisierten Mäuse (0,48-fach) ebenfalls deutlich niedriger exprimiert als im Kolon der keimfreien Mäuse. Es wurde dabei kein signifikanter Unterschied

in der Math1-Expression zwischen SPF und konventionalisierten Mäusen festgestellt. Auch die mKLF4-mRNA-Expression war in den SPF Mäusen (0,73-fach) und in konventionalisierten Mäusen (0,57-fach) signifikant niedriger. Auch hier war der Effekt von Mikrobiota in konventionalisierten Mäusen signifikant stärker als in den SPF Mäusen.

Um die Expression von mHes1, Math1 und mKLF4 auf Proteinebene zu untersuchen, wurde eine Western Blot Analyse vom distalen Kolon durchgeführt (Abb. 7D). Im Gegensatz zu den mRNA-Daten gab es keinen Unterschied in der mHes1-Protein-Expression zwischen den drei Mausgruppen. Das Math1- und mKLF4-Protein waren sowohl in den SPF als auch in den konventionalisierten Mäusen deutlich weniger exprimiert als in den keimfreien Mäusen, was die Ergebnisse der mRNA-Analyse widerspiegelte.

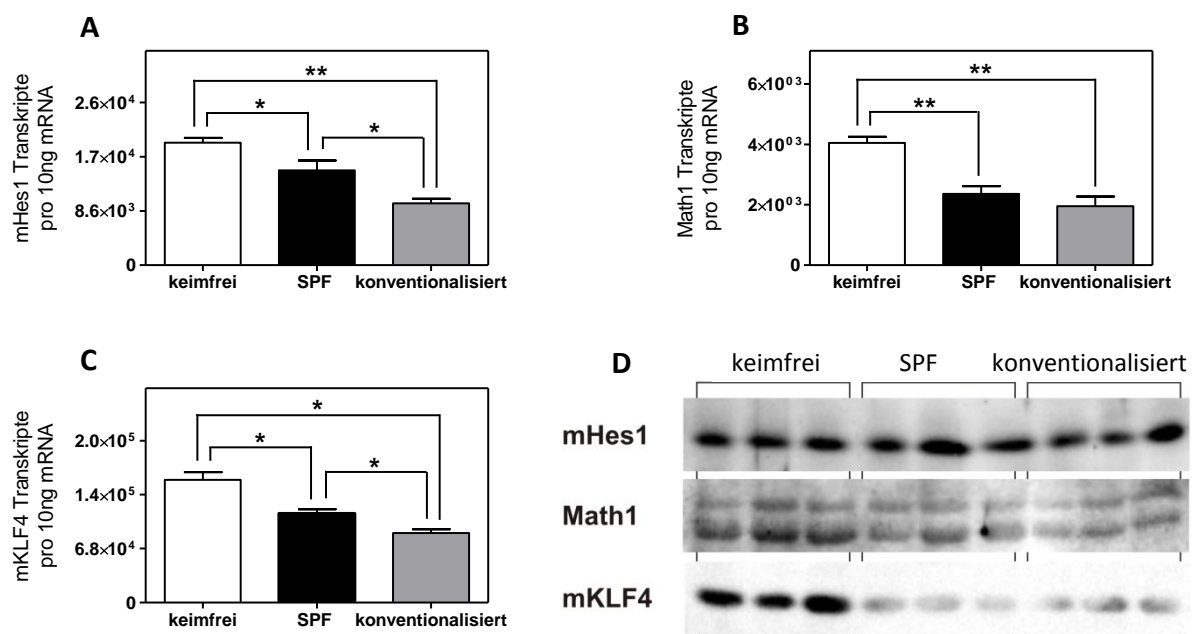


Abbildung 7: Auswirkung der gesamten intestinalen Mikrobiota auf die Expression von mHes1 (m=Maus), Math1 und mKLF4. RT-PCR Analyse der mHes1- (A), Math1- (B) und mKLF4- (C) mRNA-Expression im Kolon der keimfreien (n=7), der SPF (spezifisch-pathogen frei, n=4) und der konventionalisierten Mäuse (n=4). Die Expression von mβ-Aktin diente als interne Kontrolle. Graphisch dargestellt wurde jeweils der Mittelwert ± SEM. $p < 0,05$ (*), $p < 0,01$ (**).

Western Blot Analyse der mHes1-, Math1- und mKLF4-Protein-Expression im Kolon der keimfreien, SPF und der konventionalisierten Mäuse (D).

3.2 Der Einfluss der intestinalen Bakterien auf die Expression der Muzine Muc1 und Muc2

Des Weiteren wurde die mRNA-Expression der Muzine Muc1 und Muc2 in mit verschiedenen Keimen behandelten LS174T Zellen untersucht.

Wie bereits in der Einleitung beschrieben, handelt es sich bei Muc1 um ein membranständiges Mucin. Die Funktionen von Muc1 im Epithel sind sehr vielfältig, wobei Muc1 unter anderem die Mukosa vor Pathogenen schützt (Lindén et al., 2009; McAuley et al., 2007) und über seinen zytoplasmatischen Teil in zahlreiche Signalkaskaden der Epithelzellen eingreift (Carson, 2008). In einer gesunden intestinalen Mukosa wird Muc1 sehr niedrig exprimiert. In CED und kolorektalem Krebs wurde hingegen eine Überexpression von Muc1 beobachtet (Baldus et al., 2004; Furr et al., 2010).

Muc2 ist das häufigste sekretorische Mucin des Kolon, welches von den Becherzellen sezerniert wird und dem Mukus seine gelartige Struktur verleiht (Shirazi et al., 2000). In mehreren Studien wurde beschrieben, dass die schützende Mukusschicht im Kolon von CU-Patienten deutlich reduziert ist (McCormick et al., 1990; Pullan et al., 1994; Strugala et al., 2008; Swidsinski et al., 2007).

3.2.1 Der Effekt der einzelnen Bakterien auf die Expression von Muc1 und Muc2 *in vitro*

Um eine regulatorische Wirkung von intestinalen Bakterien auf die Muc1- und Muc2-Expression zu untersuchen, wurden LS174T Zellen mit 11 hitzeinaktivierten Keimen für 3, 6, 12 und 24h inkubiert. Wie in Abbildung 8 zu erkennen ist, wird die Muc1-mRNA in LS174T Zellen durch viele der untersuchten Bakterien induziert. Dabei bewirkte eine 3-stündige Inkubation mit den *E. coli* Stämmen Symbioflor G2 (10,3 – fach), EcK12 (11,7 – fach) oder EcN (14,1 – fach) eine besonders hohe Induktion der Muc1-mRNA-Expression, welche dann an den späteren Zeitpunkten wieder abnahm. Auch die *Lactobacilli* Stämme induzierten Muc1 signifikant (*L. fermentum*: 4,9 – fach nach 3h; *L. acidophilus*: 5,6 – fach nach 3h), wobei der Effekt bei weitem nicht so ausgeprägt war. Noch schwächer wurde Muc1 von *B. breve* (2,7 – fach nach 3h) und *B. adolescentis* (3,7 – fach nach 12h) hochreguliert. Die Inkubation von LS174T Zellen mit den *E. coli* Stämmen Symbioflor G1 und G3 sowie mit den Keimen *B. longum* und *B. vulgatus* hatte hingegen keine signifikante Veränderung der Muc1-Expression zur Folge.

Die Muc2-mRNA-Expression wurde in LS174T Zellen von keinem der untersuchten Bakterien und zu keinem der untersuchten Zeitpunkte signifikant verändert. Dabei scheint es, dass die Inkubation mit jedem der untersuchten Keime nach 24h zu einer leichten Hemmung der Muc2-mRNA-Expression führte.

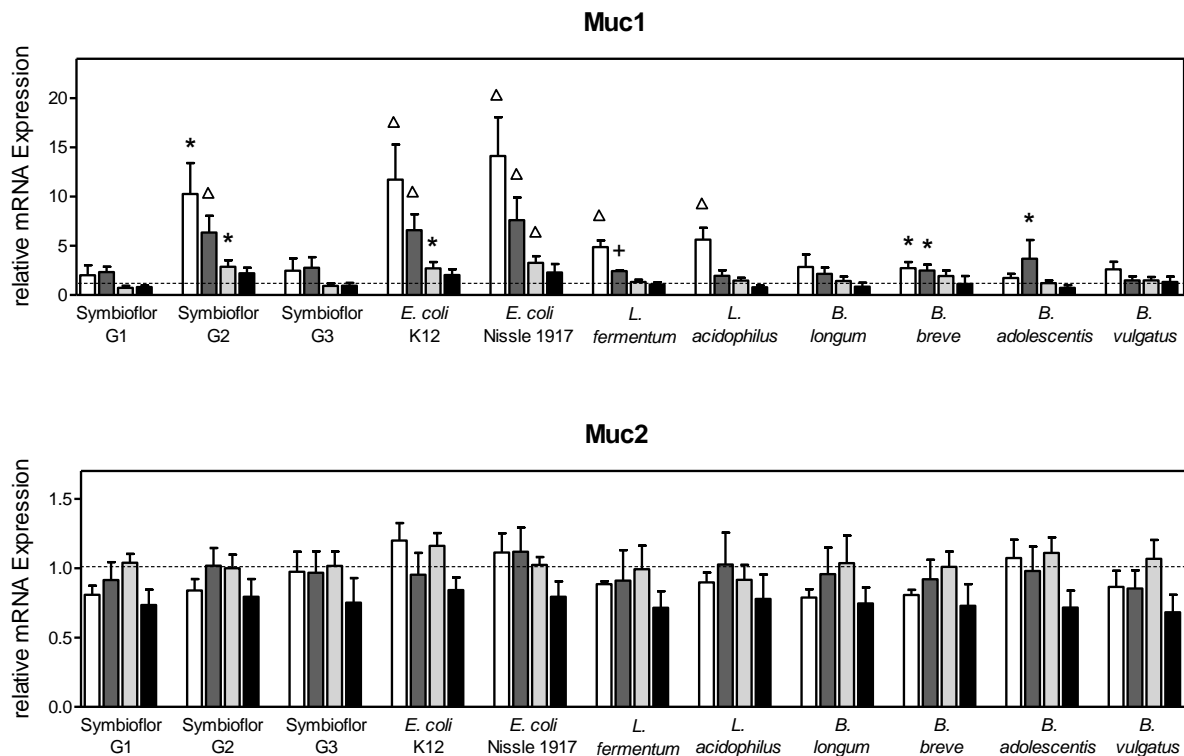


Abbildung 8: RT-PCR Analyse der Muc1- und Muc2-mRNA-Expression in LS174T Zellen nach Inkubation mit verschiedenen hitzeinaktivierten Bakterienstämmen für 3 (weiße Balken), 6 (dunkelgraue Balken), 12 (hellgraue Balken) und 24 (schwarze Balken) Stunden. Die unbehandelten Kontrollen wurden auf 1 gesetzt und sind durch die gestrichelte Linie dargestellt. Alle Experimente wurden mindestens 3-mal wiederholt und auf die Expression von β -Aktin normalisiert. Graphisch dargestellt wurde jeweils der Mittelwert \pm SEM. $p < 0,05$ (*), $p < 0,01$ (Δ) und $p < 0,001$ (+)

Für die Analyse der Proteinexpression von Muc1 und Muc2 wurde aufgrund seiner klinischen Relevanz nur der probiotische EcN eingesetzt. Dafür wurden LS174T Zellen auf den Kammerobjektträger ausplattiert und für 6 bis 48h mit hitzeinaktivierten EcN inkubiert. Anschließend wurde eine Immunfärbung des Muc1- und Muc2-Proteins durchgeführt. Die 6h lange Inkubation mit EcN führte zu einer deutlich stärkeren Muc1-Immunfärbung der LS174T

Zellen im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollen (Abb. 9). Die Muc2-Immunfärbung ist in den unbehandelten sowie in den mit EcN behandelten LS174T Zellen sehr intensiv, wobei kein systematischer Unterschied zwischen den beiden Gruppen zu erkennen war. In Abbildung 9 ist die Muc2-Immunfärbung nach 6h dargestellt, aber auch zu anderen Zeitpunkten wurden keine Unterschiede zwischen EcN-behandelten und unbehandelten Zellen festgestellt (Daten nicht gezeigt).

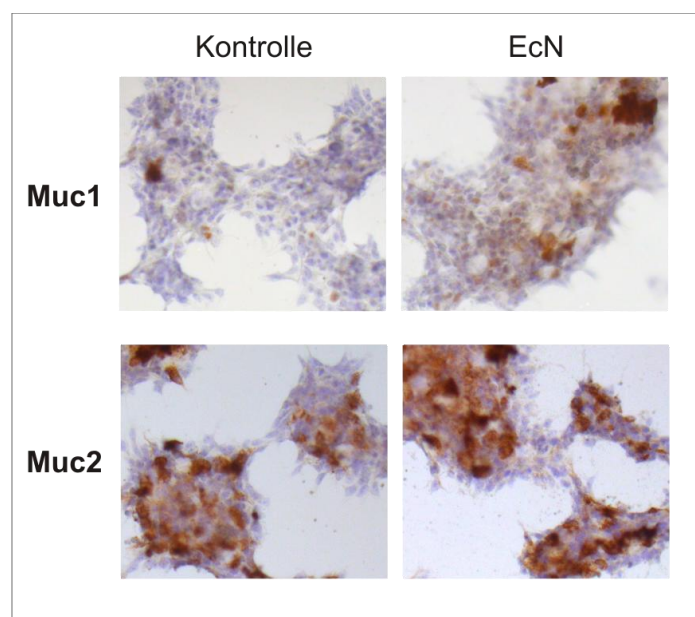


Abbildung 9: Immunzytochemische Färbung von Muc1- und Muc2-Protein in LS174T Zellen nach 6h Inkubation mit *E. coli* Nissle 1719 (EcN).

3.2.2 Der Effekt der Mikrobiota in ihrer Gesamtheit auf die Expression von Muc1 und Muc2 *in vivo*

Als Nächstes wurde die mRNA-Expression von mMuc1 und mMuc2 (m = Maus) im distalen Kolon von keimfreien, SPF und konventionalisierten Mäusen untersucht. Dabei konnten keine Unterschiede zwischen den drei Mausgruppen in der mMuc1-mRNA Expression beobachtet werden (Abb. 10). Im Kolon der SPF Mäuse war die mMuc2-mRNA tendenziell, jedoch nicht signifikant erniedrigt (1,76-fach), während zwischen den keimfreien und konventionalisierten Mäusen kein Unterschied zu beobachten war.

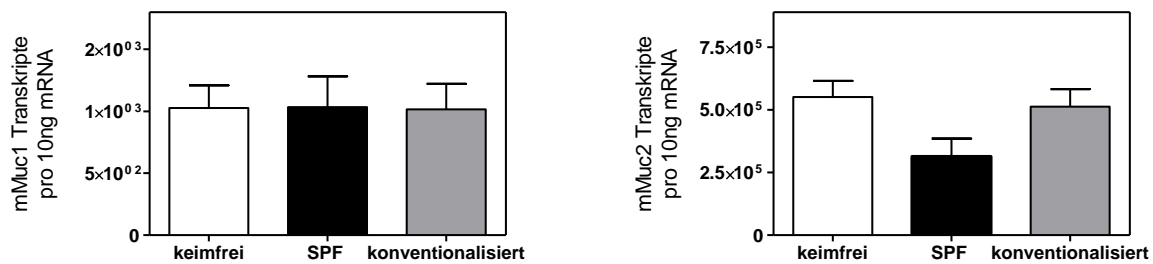


Abbildung 10: RT-PCR Analyse der mMuc1-(A) und Muc2-(B) mRNA Expression im Kolon von keimfreien (weiß, n=7), SPF (schwarz, n=4) und konventionalisierten Mäusen (grau, n=4). Die Expression von mβ-Aktin diente als interne Kontrolle. Graphisch dargestellt wurde jeweils der Mittelwert ± SEM.

3.3 Der Effekt der Mikrobiota in ihrer Gesamtheit auf die Zahl der Becherzellen

Die Anwesenheit der Darmorganismen hatte eine verminderte Expression von mHes1 auf mRNA-Ebene sowie von Math1 und mKLF4 auf mRNA- und Proteinebene zur Folge (Abb. 7). Damit hat sich sehr wahrscheinlich das Verhältnis von antisekretorischem mHes1 und den prosekretorischen Math1 und mKLF4 in Richtung eines absorptiven Zellschicksals verschoben. Um zu untersuchen, ob diese Beobachtung eine Auswirkung auf die Anzahl und die Morphologie der sekretorischen Zellen hat, wurden Gewebeschnitte des distalen Kolons von keimfreien, SPF und konventionalisierten Mäusen einer Alcian Blue Färbung unterzogen (Abb. 11A). Anschließend wurden die Zahl der Becherzellen bestimmt und zwischen den einzelnen Gruppen verglichen (Abb. 11B). Im Rahmen dieser Untersuchung wurde kein Unterschied in der Anzahl oder Morphologie der Becherzellen zwischen keimfreien, SPF und konventionalisierten Mäusen festgestellt.

Es wurden zudem auch keine deutlichen morphologischen Unterschiede in der Beschaffenheit der Darmmukosa zwischen den einzelnen Gruppen beobachtet (Abb. 12). Frühere Studien hingegen hatten in diesem Zusammenhang Unterschiede festgestellt wie eine dünnere Darmwand und kürzere Krypten. Auch die epithelialen Zellen wurden in ihrer Form und Größe als uniform beschrieben (Ishikawa et al., 1989; Thompson and Trexler, 1971). Die Furchung der Darmwand scheint allerdings in dieser Versuchsreihe in den meisten keimfreien Mäusen weniger stark ausgeprägt zu sein im Vergleich zu den SPF und

konventionalisierten Mäusen, was eine ebenfalls beschriebene Verminderung der mukosalen Oberfläche widerspiegeln könnte.

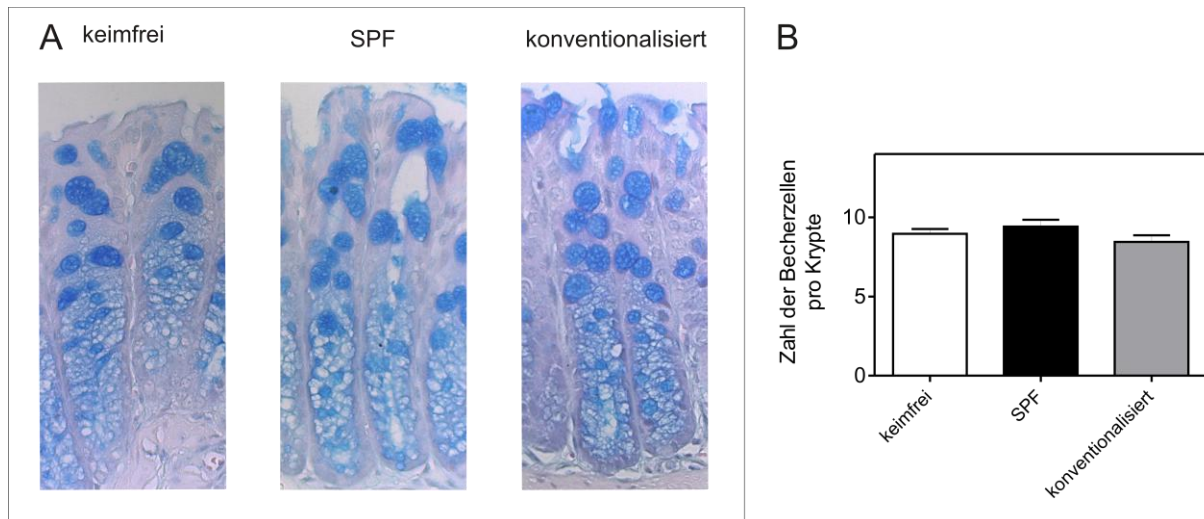


Abbildung 11: Alcian blue Färbung (40-fach vergrößert) (A) und Bestimmung der Becherzellzahl pro Krypte (B) im Dickdarm der keimfreien (n = 6), SPF (n = 4) und konventionalisierten Mäuse (n = 4). Pro Maus wurden die Becherzellen in 10 Krypten ausgezählt und gemittelt. Graphisch dargestellt wurde jeweils der Mittelwert \pm SEM.

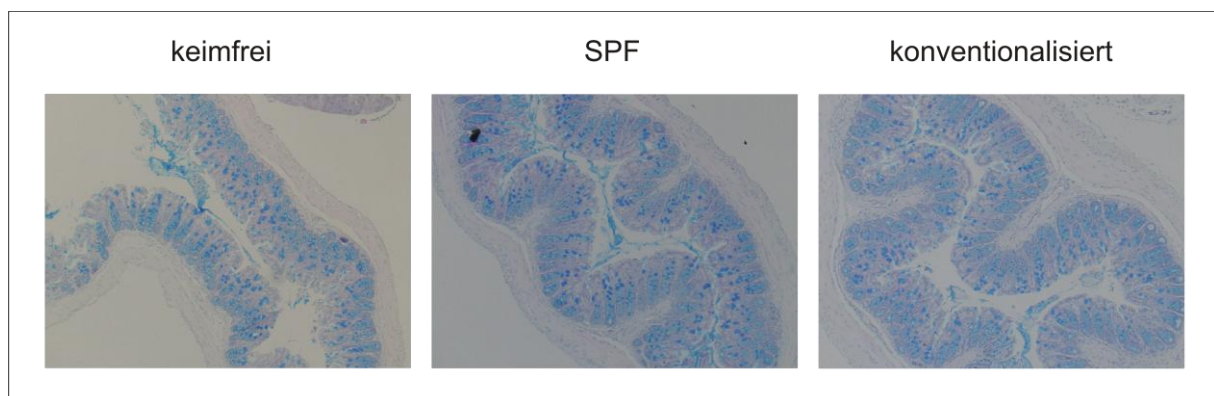


Abbildung 12: Repräsentative, Alcian blue gefärbte Querschnitte des Dickdarms von einer keimfreien, einer SPF und einer konventionalisierten Maus. 10-fach vergrößert.

3.4 Der Einfluss der intestinalen Bakterien auf die Expression der antimikrobiellen Peptide Elafin und HBD2

Elafin und HBD2 sind AMPs und stellen einen wichtigen Bestandteil der mukosalen Barriere gegen intestinale Mikroorganismen dar. Sowohl Elafin als auch HBD2 sind in einer Entzündung bei CU stark induziert, während bei MC die Induktion weniger ausgeprägt ist, was dadurch zur Schwächung der Barriere in der Entzündung beiträgt (Schmid et al., 2007; Wehkamp et al., 2002, 2003). Im Folgenden wurde die Regulation von Elafin und HBD2 in intestinalen Zellen durch intestinale Bakterien untersucht.

Zunächst wurde die Auswirkung der Inkubation von LS174T Zellen mit 11 hitzeinaktivierten intestinalen Keimen auf die Expression von Elafin und HBD2 untersucht. In unstimuliertem Zustand liegen sowohl Elafin als auch HBD2 in LS174T Zellen kaum exprimiert vor. Die Inkubation mit bestimmten Bakterien führte allerdings zu einer starken Induktion der Expression von beiden AMPs. Dabei waren die Effekte auf die mRNA-Expression von Elafin und HBD2 am stärksten nach Inkubation mit den *E. coli* Keimen Symbioflor G2 und insbesondere mit Eck12 und EcN (Abb. 13). Die Expression von Elafin stieg signifikant nach Inkubation mit Eck12 für 3h auf das 148-fache und erreichte den Höhepunkt nach 6h mit einem 279-fach erhöhten Wert. Nach 12h fiel dieser Wert wieder ab, was nach 24h noch verstärkt wurde. EcN induzierte die Elafin-Expression am stärksten nach 3h (293-fach), danach fiel das mRNA-Level mit jedem folgenden Zeitpunkt und war dennoch nach 24h noch um das 90-fache erhöht. Die Induktion der Elafin-Expression durch EcN konnte mittels einer Immunzytochemie auf Protein-Ebene bestätigt werden (Abb. 14). Auch die Inkubation mit Symbioflor G2 hatte eine starke und signifikante Induktion der Elafin-mRNA-Expression zur Folge (bis zu 62-fach nach 6h). Die Bifidobakterien *B. breve* und *B. adolescentis* lösten teilweise eine ebenfalls signifikante, jedoch viel schwächere Induktion aus (*B. breve* bis zu 26,8-fach nach 12h, *B. adolescentis* bis zu 8,8-fach nach 6h). Andere Keime hatten im Rahmen dieser Arbeit kaum nennenswerte Effekte auf die mRNA-Expression von Elafin.

Die Inkubation mit Eck12 induzierte die HBD2-mRNA-Expression nach 3h auf das 1630-fache und EcN auf das 1833-fache. Dabei blieb der mRNA-Level nach 6 und 12h ungefähr auf demselben Niveau und fiel schließlich nach 24h Inkubation stark ab. Eine Inkubation mit Symbioflor G2 hatte einen vergleichsweise viel geringeren Effekt und induzierte die HBD2-Expression bis auf das 62-fache nach 6h Inkubation, wobei auch hier der Effekt nach 24h drastisch abnahm. Auch *B. breve* hat vergleichsweise eine kleine aber signifikante Induktion

verursacht (bis zu 86-fach nach 6h), wobei die übrigen Keime auch hier kaum Effekte ausgelöst hatten.

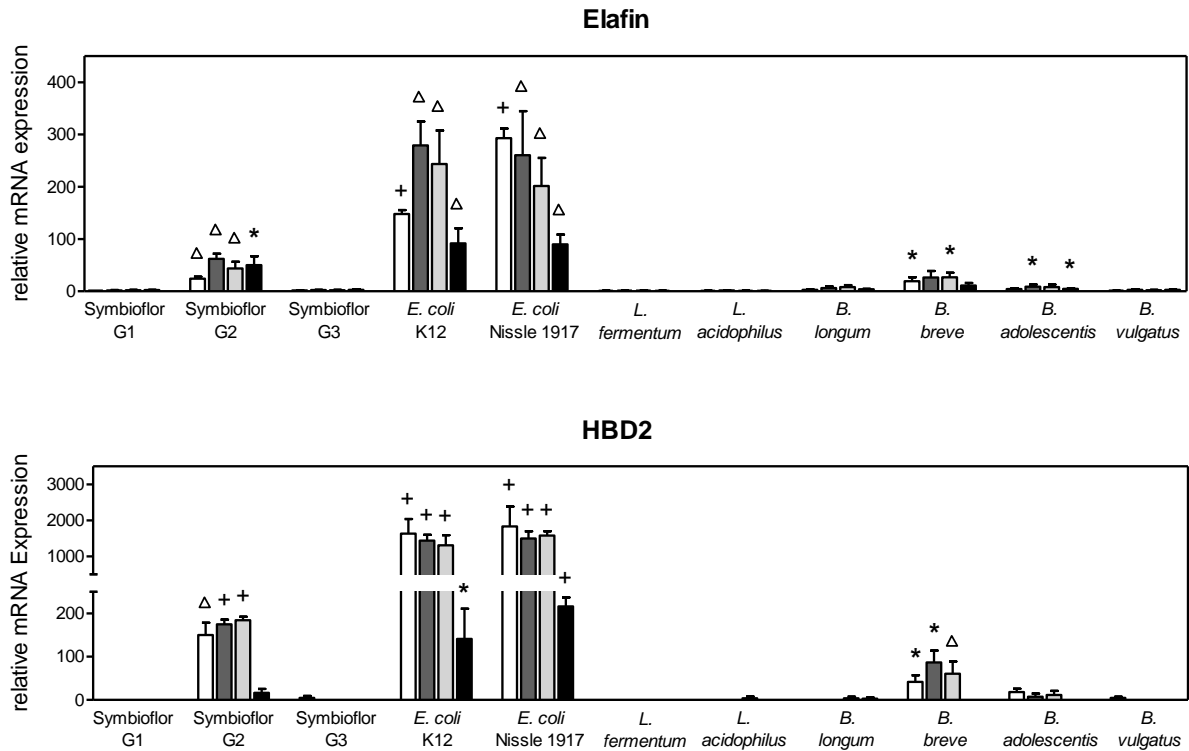


Abbildung 13: RT-PCR Analyse der Elafin- und HBD2-mRNA-Expression in LS174T Zellen nach Inkubation mit verschiedenen hitzeinaktivierten Bakterienstämmen für 3 (weiße Balken), 6 (dunkelgraue Balken), 12 (hellgraue Balken) und 24 (schwarze Balken) Stunden. Alle Experimente wurden mindestens 3-mal wiederholt und auf die Expression von β -Aktin normalisiert. Graphisch dargestellt wurde jeweils der Mittelwert \pm SEM. $p < 0,05$ (*), $p < 0,01$ (Δ) und $p < 0,001$ (+).

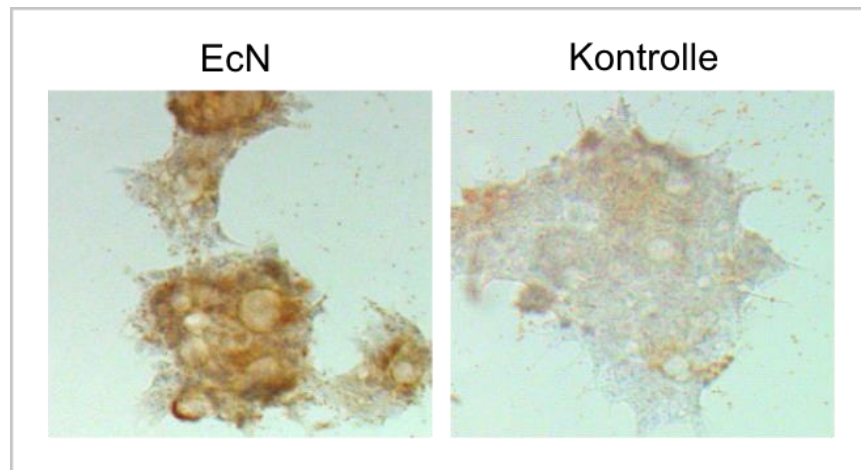


Abbildung 14: Immunzytochemische Färbung von Elafin-Protein in LS174T Zellen nach 6h Inkubation mit *E. coli Nissle* 1917 (EcN).

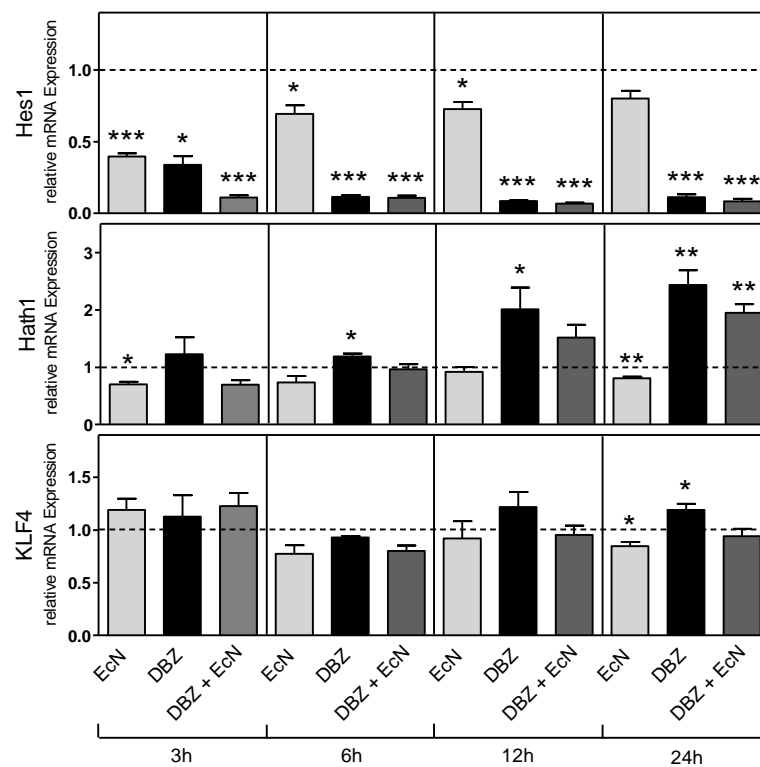
3.5 Die Rolle der Notch-Signalkaskade bei der *E. coli* Nissle-abhängigen Regulation von Hath1, KLF4, Muc1, Elafin und HBD2

In den bereits beschriebenen Versuchen hatte die Inkubation mit EcN nach 3h eine Inhibierung von Hes1 und Hath1 zur Folge, wobei zeitgleich Muc1, Elafin und HBD2 induziert wurden. Dabei stellte sich die Frage, ob der Effekt auf Muc1, Elafin und HBD2 direkt von EcN ausgelöst wurde oder indirekt über die Hemmung von Hes1 und Hath1. Es ist bekannt, dass die Notch-Signalkaskade die Expression von Hath1 und KLF4 negativ reguliert (Zheng et al., 2009, 2011). Der Zusammenhang dieser Signalgebung mit der Regulation von Muc1, Elafin und HBD2 wurde jedoch bisher noch nicht untersucht. Um dem nachzugehen, wurde in den LS174T Zellen die Notch-Signalkaskade mittels des γ -Sekretase-Blockers Dibenazepin (DBZ) gehemmt. Parallel wurden die Zellen mit EcN jeweils in An- und Abwesenheit von DBZ inkubiert. Der Versuch wurde nach 3, 6, 12 und 24h abgestoppt und anschließend die mRNA-Expression mittels RT-PCR analysiert.

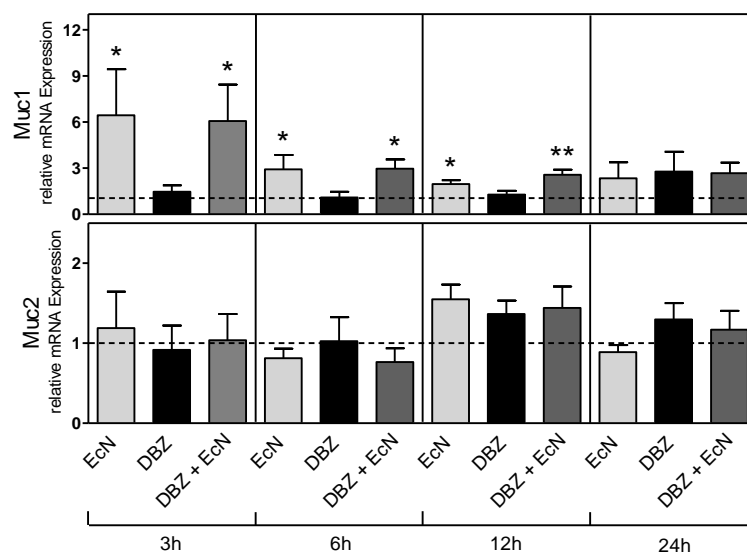
Wie erwartet, wurde die Expression des Notch-Zielgens Hes1 bereits nach 3h DBZ-Behandlung um mehr als die Hälfte reduziert und zu den späteren Zeitpunkten sogar bis auf das 0,1-fache abgesenkt (Abb. 15A). Auffällig ist, dass die Anwesenheit von EcN die Hes1-Inhibierung durch DBZ nach 3h deutlich verstärkt hat. Es war ebenfalls nicht überraschend, dass die Hath1- und KLF4-Expression etwas zeitversetzt in den Zellen mit geblockter Notch-Signalkaskade gestiegen ist.

Die Expression von Muc1 wurde von EcN signifikant induziert, wobei die Zugabe von DBZ keinen Einfluss auf diese Induktion sowie auf das Grundlevel von Muc1-mRNA in unbehandelten Zellen hatte (Abb. 15B). Die Expression von Muc2 wurde weder durch EcN- noch DBZ-Behandlung signifikant beeinflusst. Die Expression der AMPs Elafin und HBD2 wurden von EcN stark induziert und ebenfalls nicht merklich durch die Blockade der Notch-Signalkaskade verändert (Abb. 15C).

A



B



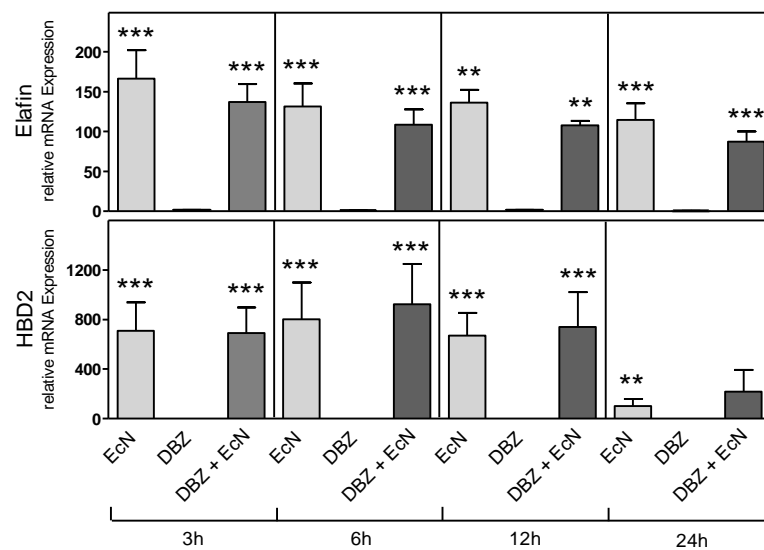
C

Abbildung 15: Der Einfluss der Hemmung der Notch-Signalkaskade auf die *E. coli* Nissle 1917 bedingte Regulation von Hes1, Hath1 und KLF4 (A) sowie Muc1 und Muc2 (B) und Elafin und HBD2 (C) in LS174T Zellen. Die LS174T Zellen wurden mit γ -Sekretase-Blocker DBZ, *E. coli* Nissle 1917 (EcN) sowie mit Kombination aus EcN und DBZ inkubiert und die Expression von Hes1, Hath1, KLF4, Muc1, Muc2, Elafin und HBD2 mittels RT-PCR analysiert. Alle Experimente wurden mindestens 3-mal wiederholt und auf die Expression von β -Aktin normalisiert. Graphisch dargestellt wurde jeweils der Mittelwert \pm SEM. $p < 0,05$ (*), $p < 0,01$ (**) und $p < 0,001$ (***)

3.6 Die Rolle von Flagellin bei der *E. coli* Nissle-abhängigen Regulation von Hes1, Hath1, Muc1, Elafin und HBD2

Wie in den oben beschriebenen Experimenten gezeigt wurde, wird die Expression der intestinalen Differenzierungsfaktoren Hes1 und Hath1 nach 3h Inkubation mit EcN deutlich herunterreguliert (Abb. 4). Zeitgleich werden durch die EcN-Inkubation das Muzin Muc1 (Abb. 8) und die AMPs Elafin und HBD2 (Abb. 13) hochreguliert. Dabei konnte im Rahmen dieser Studie kein Zusammenhang zwischen der Notch-Signalkaskade und der Regulation von Muc1, Elafin und HBD2 festgestellt werden (Abb. 15). Es konnte bereits in Caco2, einer anderen Kolonkarzinomzelllinie, gezeigt werden, dass EcN die Expression von HBD2 über das Flagellin induziert (Schlee et al., 2007). Aufgrund dieser Beobachtungen entstand die

Hypothese, dass auch Hes1, Hath1, Muc1 und Elafin über EcN-Flagellin reguliert werden könnten. Um dieser Hypothese nachzugehen, wurden LS174T Zellen mit dem hitzeinaktivierten EcN-Wildtyp und verschiedenen Deletionsmutanten EcN Δ fliA (Sigmafaktor der Flagellumgene), EcN Δ fliC (Flagellin), EcN Δ flgE (Flagellumanker), EcN Δ fim (Typ 1 Pili), EcN Δ foc (F1C Pili) und EcN Δ csgBA (Curli) (Kapitel 2.1.8.3) für 3h inkubiert. Die Veränderungen der mRNA-Expression von Hes1, Hath1, Muc1, Elafin und HBD2 wurden mittels RT-PCR analysiert. Wie man in Abbildung 16 sehen kann, haben die EcN-Flagellum-Mutanten EcN Δ fliA, EcN Δ fliC und EcN Δ flgE die Fähigkeit verloren, sowohl Hes1 und Hath1 zu inhibieren, als auch Muc1, Elafin und HBD2 zu induzieren. Im Gegensatz dazu konnte eine Inkubation mit den EcN-Mutanten EcN Δ fim, EcN Δ foc und EcN Δ csgBA die Effekte auf die untersuchten Faktoren ähnlich dem EcN-Wildtyp auslösen.

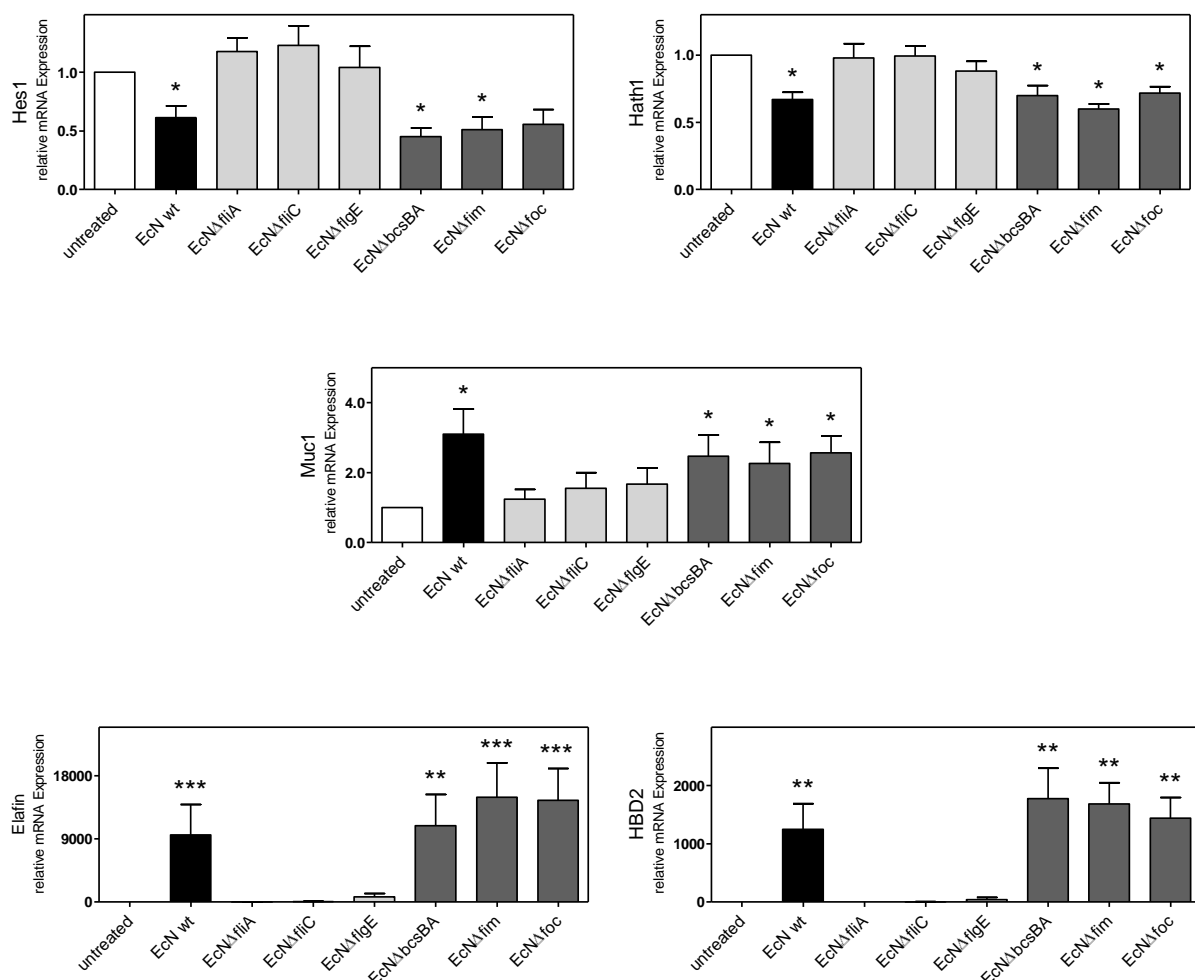


Abbildung 16: Hes1-, Hath1-, Muc1-, Elafin- und HBD2-mRNA-Expression in LS174T Zellen nach Inkubation mit dem *E. coli* Nissle 1917 (EcN) Wildtypstamm sowie mit den EcN Deletionsmutanten EcN Δ fliA (Sigmafaktor der Flagellumgene), EcN Δ fliC (Flagellin), EcN Δ flgE

(Flagellumanker), EcN Δ fim (Typ 1 Pili), EcN Δ foc (F1C Pili) und EcN Δ csgBA (Curli). Alle Experimente wurden mindestens 3-mal wiederholt und auf die Expression von β -Aktin normalisiert. Graphisch dargestellt wurde jeweils der Mittelwert \pm SEM. $p < 0,05$ (*), $p < 0,01$ (**) und $p < 0,001$ (***)

3.7 Die Rolle von TLR5 bei der *E. coli* Nissle-abhängigen Regulation von Hes1, Hath1 und Muc1, Elafin und HBD2

Im letzten Kapitel wurde beschrieben, dass EcN die Expression von Hes1, Hath1, Muc1, Elafin und HBD2 über Flagellin reguliert. Da TLR5 ein bekannter Rezeptor für Flagellin ist (Gewirtz et al., 2001), sollte in diesem Teil der Arbeit die Rolle von TLR5 in der EcN-bedingten Regulation von Hes1, Hath1, Muc1, Elafin und HBD2 untersucht werden. Dafür wurden LS174T Zellen zur Hemmung von TLR5 mit einem synthetischen TLR5-Antikörper behandelt, für 3h mit EcN inkubiert und anschließend die Expression der oben genannten Faktoren mittels RT-PCR analysiert.

Bei allen in diesem Experiment untersuchten Faktoren scheint TLR5 eine Rolle bei der EcN-abhängigen Regulation zu spielen (Abb. 17). Dabei wird der Effekt von EcN durch den Einsatz von Anti-TLR5-Antikörper teilweise oder sogar ganz aufgehoben, was sich besonderes deutlich bei Elafin und HBD2 zeigen ließ.

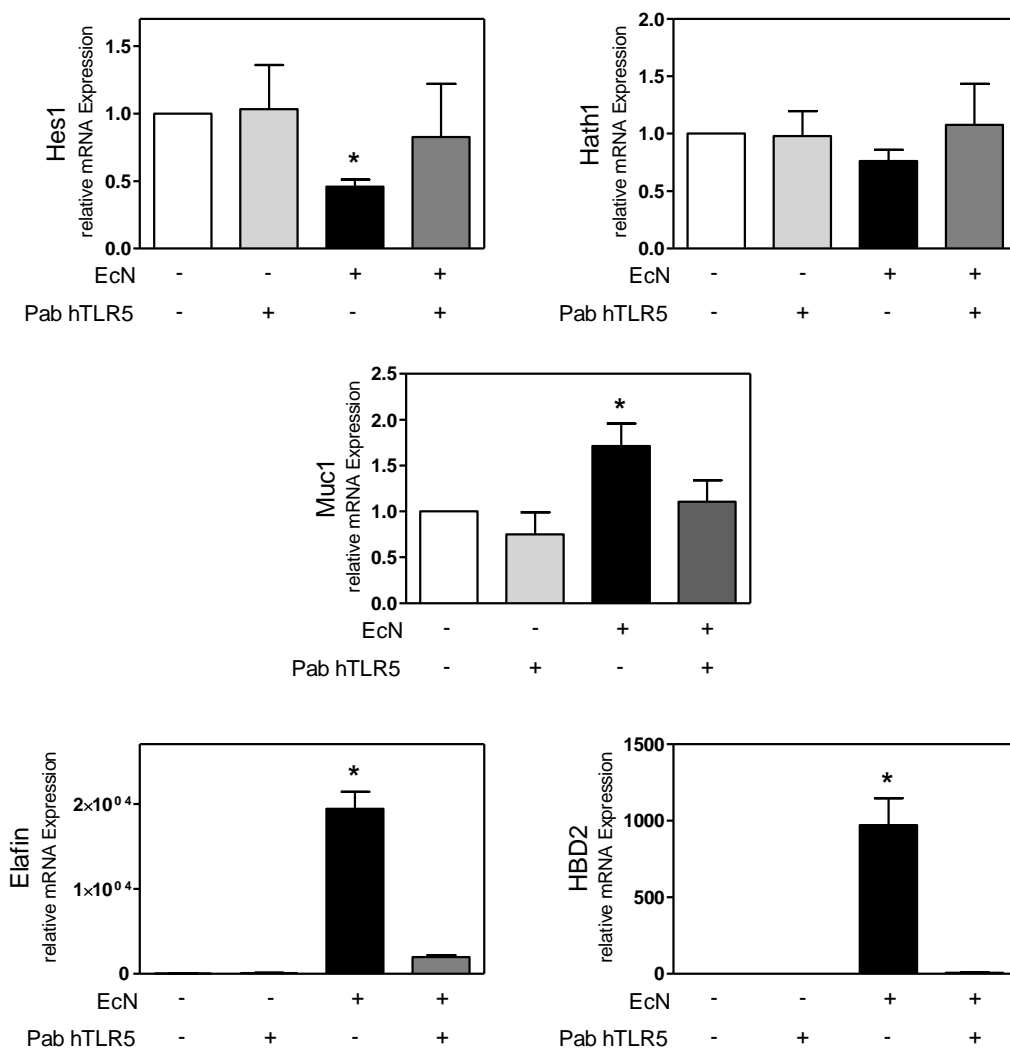


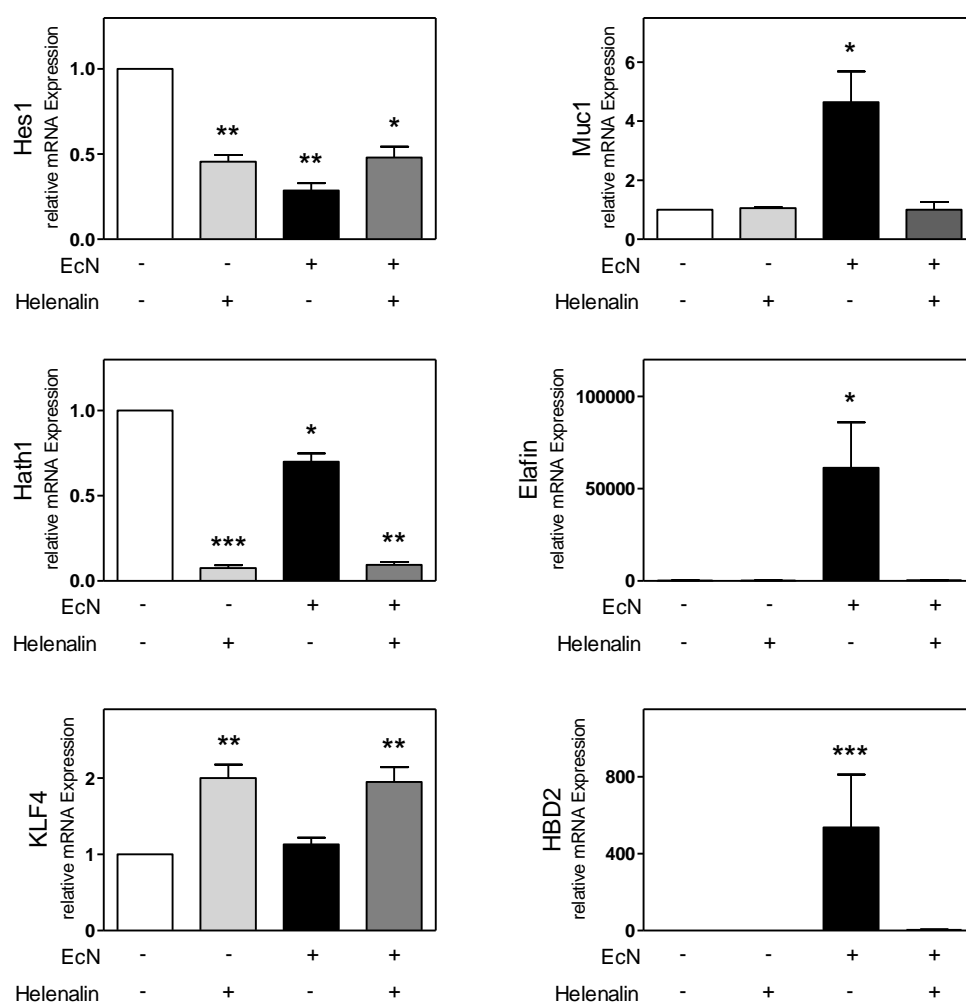
Abbildung 17: Einfluss einer TLR5-Blockade auf die *E. coli* Nissle 1917 bedingte Regulation von Hes1, Hath1 und Muc1, Elafin und HBD2 in LS174T Zellen. Die LS174T Zellen wurden mit dem TLR5-Blocker Pab hTLR5, mit *E. coli* Nissle 1917 (EcN) sowie mit Kombination aus EcN und Pab hTLR5 inkubiert und die Expression von Hes1, Hath1, Muc1, Elafin und HBD2 mittels RT-PCR analysiert. Alle Experimente wurden mindestens 3-mal wiederholt und auf die Expression von β -Aktin normalisiert. Graphisch dargestellt wurde jeweils der Mittelwert \pm SEM. $p < 0,05$ (*)

3.8 Die Rolle der NFkB-Signalkaskade bei der Regulation von Hes1, Hath1, KLF4, Muc1, Elafin und HBD2 *in vitro*

Den oben beschriebenen Versuchen ist zu entnehmen, dass die Differenzierungsfaktoren Hes1 und Hath1, sowie das Mucin Muc1 und die AMPs Elafin und HBD2 in LS174T Zellen über das EcN-Flagellin reguliert werden (Abb. 16). Es konnte auch gezeigt werden, dass der Rezeptor für Flagellin, TLR5, an der Regulation beteiligt ist (Abb. 17). Es ist bekannt, dass TLR5 die NFkB-Kaskade aktiviert (Gewirtz et al., 2001). Außerdem wurde bereits in Versuchen mit Caco-2 Zellen gezeigt, dass EcN die Expression von HBD2 über die NFkB-Signalkaskade induziert (Schlee et al., 2007; Wehkamp et al., 2004b). Um zu analysieren, ob die NFkB-Signalkaskade auch in die Regulation von Hes1, Hath1, Muc1 und Elafin involviert ist, wurden LS174T Zellen mit den NFkB-Blockern Helenalin (Abb. 18A) oder Bay 11-7082 (Abb. 18B) behandelt und mit EcN inkubiert.

Die Blockade von NFkB-Signalkaskade führte zu einer starken Hemmung der Hes1- sowie der Hath1-mRNA-Expression. Dieser Effekt konnte mit beiden Blockern bestätigt werden. Dabei verringerte Helenalin die Hes1-Expression auf das 0,46-fache und die Hath1-Expression auf das 0,08-fache. Bay 11-7082 hemmte die Hes1-Expression auf das 0,58-fache und die Hath1-Expression auf das 0,63-fache. Auch die aus NFkB-Blockern und EcN kombinierte Behandlung führte zu einem ähnlich starken Absenken der Hes1- und Hath1-Expression. Die Expression von KLF4 dagegen wurde durch die Behandlung mit beiden NFkB-Blockern unabhängig von der EcN-Zugabe mindestens um das 2-fache induziert.

Die Blockade der NFkB-Signalkaskade wirkte sich deutlich negativ auf die Induktion von Muc1 und Elafin durch EcN aus. Auch die Abhängigkeit der EcN-bedingten HBD2-Induktion konnte in den LS174T Zellen bestätigt werden.

A

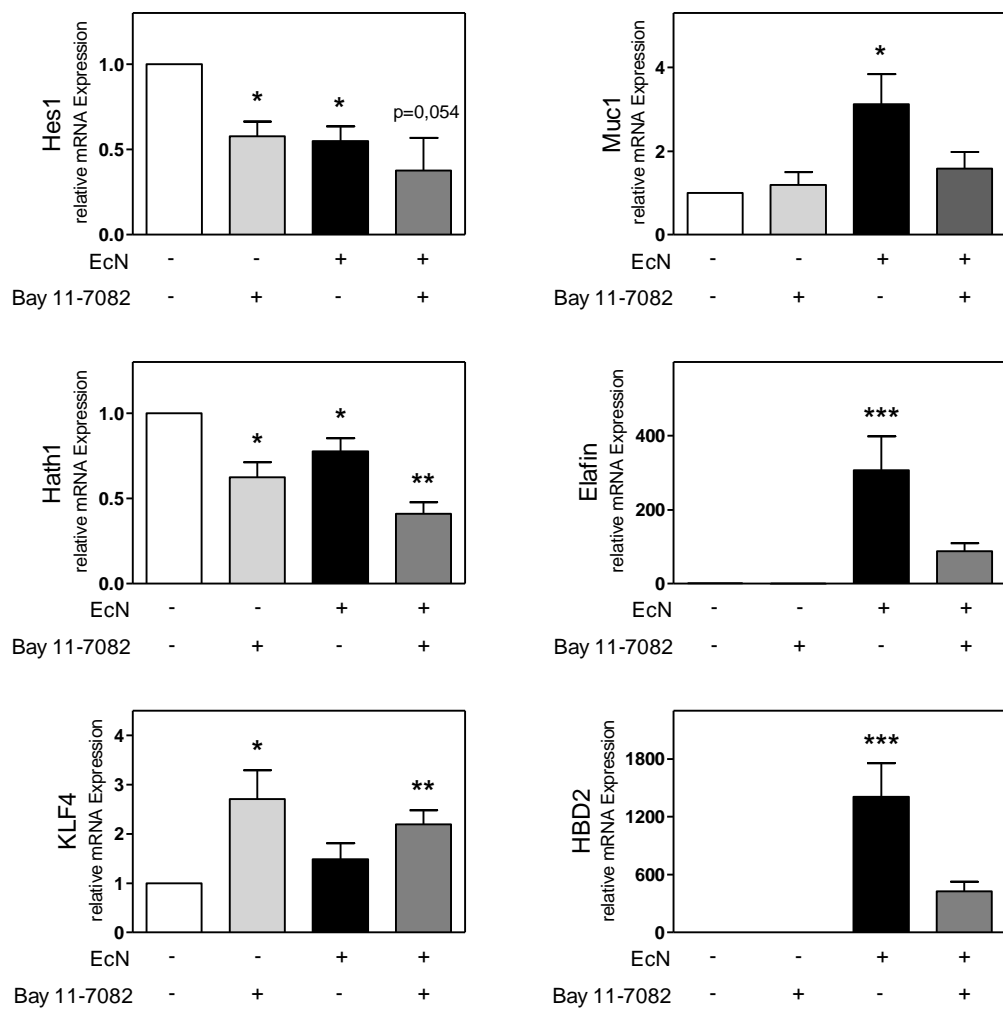
B

Abbildung 18: Einfluss der Hemmung der NFkB-Signalkaskade auf die Expression und die *E. coli* Nissle 1917 bedingte Regulation von Hes1, Hath1, KLF4, Muc1, Elafin und HBD2 in LS174T Zellen. Die LS174T Zellen wurden mit den NFkB-Blockern Helenalin (**A**) und Bay 11-7082 (**B**), mit *E. coli* Nissle 1917 (EcN) sowie mit einer Kombination aus EcN und einem der Blocker behandelt und die Expression von Hes1, Hath1, KLF4, Muc1, Elafin und HBD2 mittels RT-PCR analysiert. Alle Experimente wurden mindestens 3-mal wiederholt und auf die Expression von β -Aktin normalisiert. Graphisch dargestellt wurde jeweils der Mittelwert \pm SEM. $p < 0,05$ (*), $p < 0,01$ (**) und $p < 0,001$ (***)

3.9 Die Rolle der NFkB-Signalkaskade bei der Regulation von Hes1, Math1, KLF4 und Muc1 *in vivo*

Als Nächstes sollte die Auswirkung der Blockade der NFkB-Signalkaskade auf die Transkription der Differenzierungsfaktoren mHes1 (m=Maus), Math1, mKLF4, sowie der Muzine mMuc1 und mMuc2 *in vivo* untersucht werden. Dafür wurden Mäuse mit einer in den intestinalen Epithelzellen spezifisch vorliegenden NEMO-Deletion verwendet (Nenci et al., 2007) und die Expression der oben genannten Faktoren im Dünndarm (Duodenum, Jejunum und Ileum) und im Dickdarm (proximaler und distaler Kolon) mittels RT-PCR untersucht. Es handelte sich dabei um Mäuse mit SPF Darmmikroorganismen. Die Expression von AMPs in den NEMO knockout-Mäusen wurde bereits in einer vorausgehenden Studie analysiert (Nenci et al., 2007) und wird im Diskussionsteil detailliert beschrieben.

Bei allen drei untersuchten Abschnitten des Dünndarms konnte kein signifikanter Unterschied zwischen NEMO knockout- und wt-Mäusen in der Expression von mHes1 und mKLF4 festgestellt werden, während die Expression von Math1 im Jejunum der NEMO knockout-Mäuse tendenziell und im Ileum signifikant erniedrigt war. Die Muzine mMuc1 und mMuc2 waren im Dünndarm der NEMO knockout-Mäuse im Vergleich zu den wt-Mäusen unverändert (Daten nicht gezeigt). Im Dickdarm hingegen war die Expression von mHes1 im proximalen Kolon (2,3-fach) und von Math1 sowohl im proximalen (2,8-fach) als auch im distalen (1,6-fach) Kolon der NEMO knockout-Mäuse im Vergleich zu den wt-Tieren signifikant erniedrigt (Abb. 19). Dabei war auch die mKLF4-Expression im proximalen Kolon 1,9-fach jedoch nicht signifikant und im distalen Kolon 1,7-fach und signifikant herunterreguliert. Auch die mMuc1-Expression war im proximalen Kolon der NEMO knockout-Mäuse tendentiell (1,5-fach) und im distalen Kolon stark (7,3-fach) und signifikant erniedrigt. Die mMuc2-Expression war sowohl im proximalen Kolon (1,8-fach) als auch im distalen Kolon (1,9-fach) der NEMO knockout-Mäuse herunterreguliert, wobei durch die starke Variabilität der Messwerte die Unterschiede nicht signifikant waren.

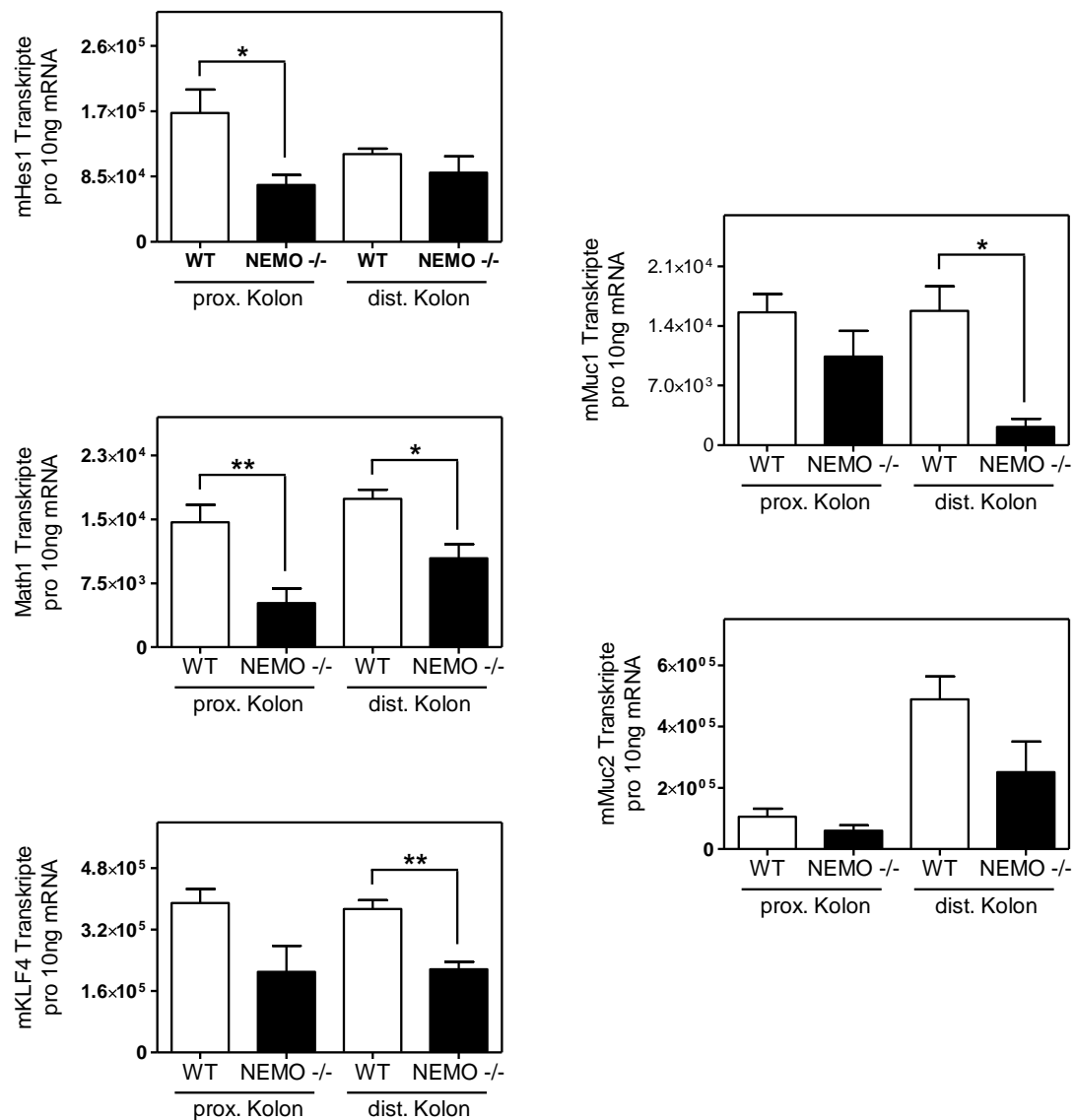


Abbildung 19: Der Einfluss der NFκB-Signalkaskade auf die intestinale Expression von mHes1 (m=Maus), Math1, mKLF4, sowie mMuc1 und mMuc2 *in vivo*. Die mRNA-Expression im Dickdarm von Wildtyp-Mäusen (WT, n=6) und von Mäusen mit einer in den intestinalen Epithelzellen spezifisch vorliegenden NEMO-Deletion (NEMO-/-, n =4) wurde mittels RT-PCR analysiert. Die Expression von β-Aktin diente als interne Kontrolle. Graphisch dargestellt wurde jeweils der Mittelwert ± SEM. p < 0,05 (*) und p < 0,01 (**)

Ergebnisse im Überblick:

- 1) Intestinale Bakterien, insbesondere EK12 und EcN, inhibieren die Expression von Hes1, Hath1 und KLF4 und induzieren die Expression von Muc1, Elafin und HBD2 in LS174T Zellen.
- 2) Die Anwesenheit der SPF Mikrobiota hat einen hemmenden Effekt auf die Expression von Hes1, Math1 und KLF4 im Dickdarm der Maus.
- 3) EcN reguliert die Expression von Hath1, Hes1, Muc1, Elafin und HBD2 über TLR5/Flagellin in LS174T Zellen.
- 4) Die NFkB-Signalkaskade ist in die EcN-vermittelte Regulation von Muc1, Elafin und HBD2 in LS174T Zellen involviert.
- 5) Die Blockade der NFkB-Signalkaskade hat einen hemmenden Effekt auf die Expression von Hes1 und Hath1 und einen induzierenden Effekt auf die Expression von KLF4 in LS174T.
- 6) Die Blockade der NFkB-Signalkaskade hat einen hemmenden Effekt auf die Expression von Hes1, Math1, KLF4, Muc1 und tendenziell Muc2 im Dickdarm der Maus.

4. Diskussion

Die intestinalen Bakterien und der Wirt haben über Jahrtausende eine mutualistische Beziehung aufgebaut, welche in der Regel auf einem gegenseitigen Nutzen basiert (Hooper and Gordon, 2001). Eine funktionierende intestinale Barriere ist der Schlüssel zu einer friedvollen Koexistenz zwischen Wirt und Darmmikrobiota. Viele der vielfältigen Funktionen der schützenden intestinalen Barriere wie Sekretion von AMPs und Muzinen werden von dem einschichtigen Darmepithel ausgeübt (Gersemann et al., 2012). Dabei werden das Wachstum, die Ausbreitung und die Zusammensetzung der intestinalen Mikrobiota kontrolliert. Aber auch die kommensalen Mikroorganismen beeinflussen ihren Wirt und sind schon lange dafür bekannt, einen großen Einfluss auf die Morphologie und Funktion des Gastrointestinaltraktes zu haben (Macpherson and Harris, 2004; Shirkey et al., 2006; Thompson and Trexler, 1971). Hooper stellte in ihrem Review die Hypothese auf, dass die intestinale Mikrobiota ein wichtiger Umweltfaktor sei, welcher die Genexpression in den genetisch prädisponierten Zellen steuert und damit für die Ausreifung des adulten Gastrointestinaltraktes unentbehrlich sei (Hooper, 2004). Viele Studien haben sich mit der Fragestellung beschäftigt, ob und durch welche Mechanismen die an der mukosalen Barriere beteiligten Faktoren einer mikrobiellen Modulation unterliegen. So wurden zum Beispiel die Expressionsprofile von keimfreien und besiedelten Tieren verglichen. Dabei wurden Veränderungen in der Expression von Genen beobachtet, welche in Immunantwort, Ausbildung des Zytoskeletes, xenobiotischen Metabolismus, Apoptose und postnatale intestinale Reifung involviert sind (Fukushima et al., 2003; Hooper et al., 2001; Mutch et al., 2004). Die Auswirkung des intestinalen Mikrobioms sowie von bestimmten Keimen auf das Epithel und die regulatorischen Mechanismen sind bisher nicht vollständig aufgeklärt. Daher fokussierte diese Arbeit auf die Aufklärung der Regulation einiger Bestandteile der intestinalen Barriere und untersuchte den bakteriellen Einfluss auf die Expression von epithelialen Differenzierungsfaktoren Hes1, Hath1 und KLF4 sowie den Muzinen Muc1 und Muc2 und den induzierbaren AMPs Elafin und HBD2.

4.1 Der Einfluss von intestinalen Bakterien auf die Expression der Differenzierungsfaktoren Hes1, Hath1 und KLF4

Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass bestimmte intestinale Bakterien die Expression der Differenzierungsfaktoren Hes1, Hath1 und KLF4 in der kolonalen Adenokarzinomazelllinie LS174T regulieren. Die Antagonisten Hes1 und Hath1 spielen bei der frühen Determinierung intestinaler Vorläuferzellen eine wichtige Rolle. Sie entscheiden, ob diese eine sekretorische oder eine absorptive Laufbahn einschlagen. Der Transkriptionsfaktor KLF4 ist in die spätere Spezialisierung eines sekretorischen Vorläufers zu einer Becherzelle involviert (van der Flier and Clevers, 2009). Wie bereits in der Einleitung ausführlich beschrieben, ist außerdem eine veränderte Expression dieser Faktoren im Darm mit bestimmten intestinalen Erkrankungen wie CED und Krebs assoziiert (Choi et al., 2006; Gerseman et al., 2009; Kazanjian and Shroyer, 2011; Leow et al., 2004).

Die Expression aller drei Differenzierungsfaktoren wurde durch Inkubation mit einigen in dieser Studie untersuchten Keimen reguliert. Die Effekte der Bakterien EcK12 und EcN waren besonders deutlich. Beide Keime regulierten die Expression von Hes1 und Hath1 herunter, wobei die leichte Hemmung der KLF4-Expression zeitlich etwas versetzt folgte. Da KLF4 möglicherweise unter der Regulation von Hath1 steht (van der Flier and Clevers, 2009), könnte das spätere Absinken des KLF4-Expressionslevels als Folge der Hath1-Herunterregulation gedeutet werden. Auch andere untersuchte Bakterien wie Symbioflor G2 hatten einen zum Teil signifikanten Effekt auf die Expression von Hes1, Hath1 und KLF4, der aber bei weitem nicht so eindeutig war wie der von EcK12 und EcN. Die Ursachen für die unterschiedlichen Effekte einzelner Keime auf die Regulation der untersuchten Faktoren könnten an den spezifischen MAMPs liegen, welche über die spezifischen PRRs der Wirtszelle erkannt werden und einzeln oder in Kombination bestimmte Prozesse auslösen (Akira et al., 2006). Die Bestandteile von EcN-Membran, welche in die regulatorischen Effekte auf die untersuchten Faktoren involviert sind, wurden im Rahmen dieser Arbeit untersucht. Die Ergebnisse hierzu werden später diskutiert. Wegen der starken Effekte und der therapeutischen Relevanz wurden die nachfolgenden Versuche mit EcN fortgesetzt. Auf Proteinebene konnten die inhibitorischen Effekte von EcN auf Hes1, Hath1 und KLF4 mittels Western Blot Analyse bestätigt werden.

In früheren Studien wurde bereits eine mikrobielle Regulation von Hes1, Hath1 und KLF4 beobachtet. So wurde die Noch1/Hes1-Signalkaskade in mit *Mycobacterium bovis* infizierten

Makrophagen über TLR2 aktiviert (Kapoor et al., 2010; Narayana and Balaji, 2008). Auch das Lipopolysaccharid des pathogenen Bakteriums *Porphyromonas gingivalis* konnte die Notch1-Signalkaskade und damit auch die Hes1-Expression in Prä-Osteoblasten aktivieren und hemmte somit deren Differenzierungsprozess (Xing et al., 2010). *Salmonella typhimurium* dagegen hemmte die Hes1-Expression in murinen embryonalen Fibroblasten (Park et al., 2005). In einer vor kurzem erschienen Studie wurde gezeigt, dass *H. pylori* die Expression von Hes1 in gastrischen Epithelzellen inhibiert und die Expression von Hath1 induziert (Zhang et al., 2012). Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass die Expression von KLF4 in mit Lipopolysaccharid von *P. gingivalis* infizierten Makrophagen induziert wird (Zhou and Amar, 2007).

Außerdem wurde die Frage gestellt, ob vergleichbare Effekte auf die Expression von Hes1, Hath1 und KLF4 auch von intestinalen Mikrobiota in ihrer Gesamtheit vorliegen. Um dieser Frage nachzugehen, wurde die Expression im Kolon von keimfreien, SPF besiedelten sowie keimfrei aufgezogenen dann aber konventionalisierten Mäusen untersucht. Dabei stellte sich heraus, dass die mRNA-Expression sowohl von mHes1 (m=Maus) als auch von Math1 (Maushomolog zu humanem Hath1) und von mKLF4 im Kolon der SPF besiedelten und der konventionalisierten Mäuse im Vergleich zu den keimfreien Tieren deutlich herunter reguliert war. Dies konnte auf Proteinebene für Math1 und KLF4, jedoch nicht für Hes1 bestätigt werden. Eventuell unterliegt Hes1 einer posttranskriptionalen Regulation oder der Unterschied ist nicht groß genug, um ihn visuell im Western Blot zu detektieren. Inwiefern sich die erniedrigte mRNA dennoch in funktionelle Unterschiede in den durch Hes1 regulierten Vorgängen übersetzen lässt, wäre eine interessante Frage für zukünftige Studien. Alle drei Faktoren, davon Hes1 und KLF4 signifikant, scheinen in den konventionalisierten Mäusen noch mehr herunterreguliert zu sein als in den SPF besiedelten Mäusen. Dies könnte man dadurch erklären, dass das Wachstum der verschiedenen Bakterienspezies nicht gleich schnell ist und deswegen die Zusammensetzung der Mikroorganismen in den SPF von den konventionalisierten Mäusen abweicht (Fukushima et al., 1999).

Es wurde bereits beobachtet, dass die intestinalen Mikrobiota einen Einfluss auf die Regeneration und Differenzierung des intestinalen Epithels haben, wobei die zugrunde liegenden Mechanismen noch nicht vollständig aufgeklärt sind (Shirkey et al., 2006; Gordon et al., 1997; Thompson and Trexler, 1971). Die Ergebnisse dieser Arbeit lassen im Zusammenhang mit vorhergehenden Studien den Schluss zu, dass Bakterien einen direkten

Einfluss auf die Expression der Differenzierungsfaktoren Hes1, Hath1 und KLF4 haben. Dies könnte zu einem besseren Verständnis der Interaktion von Mikrobiota und Wirt beitragen. Dabei wird klar, dass je nach Bakterienstamm die regulatorischen Effekte unterschiedlich ausfallen können. Die Erkenntnisse der Rolle von intestinalen Mikroorganismen bei der Regulation dieser Faktoren können zudem zu einem besseren Verständnis der Entstehung von intestinalen Erkrankungen führen. Auch die Kombination aus der genetischen Prädisposition des Wirtes und des bakteriellen Einflusses könnte einige Puzzleteile der bisherigen Erkenntnisse zusammenführen.

4.2 Der Einfluss von intestinalen Bakterien auf die Expression der Muzine Muc1 und Muc2 und die Becherzellzahl

Im Rahmen dieser Studie wurde des Weiteren der mikrobielle Einfluss auf die Expression der Muzine Muc1 und Muc2 untersucht. Muc1 ist ein membranständiges Mucin, welches neben seiner protektiven Rolle (Lindén et al., 2009; McAuley et al., 2007) auch als ein Rezeptor fungiert und in die Signalgebung der Zelle eingreift (Carson, 2008). Muc2 ist das wichtigste sekretorische Mucin des Kolons und trägt am stärksten zur Ausbildung der schützenden Mukusschicht bei (Shirazi et al., 2000; Van der Sluis et al., 2006).

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Expression von Muc1 durch Inkubation mit *Bifidobacteria* und *Lactobacilli*, aber vor allem durch die *E. coli* Stämme Symbioflor G2, EcK12 und EcN in LS174T Zellen induziert werden kann. Die Muc2-Expression dagegen wurde durch keinen der eingesetzten Keime signifikant verändert. Jedoch konnte beobachtet werden, dass die Muc2-Expression nach Inkubation mit jedem der getesteten Keime nach 24h etwas erniedrigt war. Ob dies nur ein zufälliger Effekt oder ein generelles Phänomen ist, welches nach längerer Inkubation eventuell verstärkt werden kann, könnte in künftigen Experimenten mit zusätzlichen Bakterienstämmen und zu weiteren Zeitpunkten systematisch untersucht werden. Die mRNA-Daten konnten auf Proteinebene mittels immunzytologischen Muc1- bzw. Muc2-Färbungen nach Inkubation der Zellen mit EcN bestätigt werden.

Generell kann man der Literatur entnehmen, dass eine Vielzahl von Bakterien, ob pathogen oder nicht, die Mucinexpression und/oder Mucinsekretion in Epithelzellen regulieren kann (Deplancke and Gaskins, 2001). So führte die Behandlung von LS174T und T84 Zellen, einer anderen kolonalen Zelllinie, mit Überständen der probiotischen Mischung VSL#3 zu einer

verstärkten Mukussekretion (Caballero-Franco et al., 2007). In HT29 Zellen, ebenfalls Kolonadenokarzinomzellen, welche mit lebenden EcN infiziert wurden, konnte man keine Veränderung der mRNA- und Protein-Expression von Muc1 sowie von Muc2 beobachten. Die Behandlung mit der probiotischen Mischung VSL#3 hingegen führte zu einer transkriptionellen Induktion von Muc2 (Otte and Podolsky, 2004). In einer Studie von Mack et al. induzierte *L. plantarum* und *L. rhamnosus*, jedoch nicht *L. acidophilus* die Muc2-Expression in HT29 Zellen (Mack et al., 2003). Eine Behandlung von LS174T Zellen mit *Salmonella*-Flagellin induzierte die Expression von Muc2 (Croix et al., 2011). In respiratorischen Epithelzellen konnte Muc1 durch Inkubation mit Lysaten aus *Haemophilus influenzae* über TLR2 induziert werden (Kyo et al., 2012). Es gibt aber auch Keime, welche die Fähigkeit besitzen, die Muzinexpression zu hemmen. So konnte gezeigt werden, dass eine Infektion von Magenkarzinomzellen mit *H. pylori* zu einer verminderten Expression von Muc1 sowie Muc5AC, das wichtigste sekretorische Muzin im Magen, führt (Byrd et al., 2000). Aus den diskutierten Studien kann man feststellen, dass Muc1 und Muc2 je nach Bakterienstamm und Zelllinie unterschiedlich reguliert werden. Die Unterschiede innerhalb der beschriebenen Studien und dieser Arbeit können sich eventuell aus der oft nicht gänzlich gleichen Methodik ergeben. Für diese Arbeit wurden zum Beispiel Hitze-inaktivierte anstelle von lebenden Keimen verwendet. Des Weiteren wurden die bakteriellen Metabolite im Konditionsmedium nicht mit in die Experimente einbezogen und sollten künftig untersucht werden. Interessanterweise wurde die Muc2-Expression in den für die hier beschriebene Studie verwendeten LS174T Zellen auch nicht durch andere Stimulantien verändert, wie zum Beispiel TNF α , IL-4 oder IL-13 (Daten nicht gezeigt). Diese sind jedoch dafür bekannt, die Muc2-Expression auch in LS174T Zellen zu induzieren (Iwashita et al., 2003). Es kann vermutet werden, dass sich die verwendeten Zellen mit der Zeit etwas abwandeln und, wenn auch gleichen Ursprungs, sich doch nach dem Splitten und Kultivieren in verschiedenen Laboren unterschiedlich entwickeln und somit auch unterschiedlich reagieren können.

Die *in vivo* Untersuchungen im Rahmen dieser Arbeit haben ergeben, dass die Präsenz von kommensalen Bakterien in ihrer Gesamtheit keinen Einfluss auf die Muc1-mRNA-Expression im Kolon der Maus zu haben scheint. Die Muc2-Expression war in den SPF Mäusen im Vergleich zu den keimfreien und konventionalisierten Mäusen zwar erniedrigt, der Unterschied war jedoch nicht signifikant. Die früheren *in vivo* Studien, welche einen

bakteriellen Einfluß auf Muzinexpression untersucht haben, zeigten zum Teil unterschiedliche Effekte der Darmmikrobiota auf die Expression von Muc1 und Muc2. Dabei schienen viele Faktoren wie die Zusammensetzung der Darmmikrobiota, das Alter der Versuchstiere, Dauer der Konventionalisierung und Diät eine Rolle zu spielen (Bergström et al., 2012; Comelli et al., 2008; Schwerbrock et al., 2004). Dies macht es schwierig, eine gezielte Aussage über die Wirkung der Gesamtmikrobiota auf die Muzinexpression zu geben. Auch wenn diese *in vivo* Studie keine Effekte auf die Expression von Muc1 und Muc2 zeigen konnte, sprechen die *in vitro* Experimente und andere Arbeiten für eine bakterielle Regulation der Muzine. Das Verständnis für den bakteriellen Einfluß auf die Regulation von Muzinen wie Muc1 und Muc2 könnte eventuell zu neuen Erkenntnissen bezüglich der Funktion der mukosalen Barriere führen. Auch die Tatsache, dass Muc1 über seinen zytoplasmatischen Teil in die Signalgebung eingreift (Carson, 2008), könnte einen Verbindung zwischen Mikroorganismen und Funktion des intestinalen Epitheliums aber auch intestinalen Erkrankungen wie CRC schaffen.

In den vorhergehenden Kapiteln wurde beschrieben, dass die Expression der Transkriptionsfaktoren Hes1, Math1 und KLF4 in den bakteriell besiedelten Mäusen herunterreguliert ist. Diese Faktoren spielen bei der Differenzierung des intestinalen Epithels und der Regulation von epithelialen Produkten wie Muzinen eine wichtige Rolle. So wird die Reifung der Becherzellen und die Sekretion von Muc2 über Math1 und KLF4 reguliert (Katz et al., 2002; Park et al., 2006; Yang et al., 2001). Außerdem wurden verschiedene Abweichungen in der Morphologie des Gastrointestinaltraktes von keimfreien Tieren beschrieben, wie eine dünnere Darmwand, eine verkleinerte mukosale Oberfläche und das Vorhandensein von unreifen Epithelzellen. Auch wurden die Becherzellen von keimfreien Nagern als kleiner und weniger zahlreich beschrieben (Thompson and Trexler, 1971; Szentkúti et al., 1990; Kandori et al., 1996; Meslin et al., 1999; Ishikawa et al., 1989). Um zu untersuchen, ob auch in dieser Studie die Anwesenheit von intestinalen kommensalen Mikroorganismen eine Auswirkung auf die Morphologie des Kolonepithels und der Becherzellen hat, wurden histologische Schnitte von keimfreien, SPF und konventionalisierten Mäusen einer Alcian Blue Färbung unterzogen und miteinander verglichen. Im Gegensatz zu den Ergebnissen anderer Arbeitsgruppen war die Anzahl der Becherzellen in den drei Gruppen nicht unterschiedlich. Die Unterschiede zu Ergebnissen aus

der Literatur wurden möglicherweise durch Abweichungen in den Versuchsbedingungen verursacht. Die Versuchstiere in vorhergehenden Studien waren zum Teil jünger, hatten einen anderen genetischen Hintergrund oder andere Haltungsbedingungen. Die Darmwand der hier untersuchten keimfreien Mäuse scheint jedoch etwas weniger Furchen aufzuweisen als es in den konventionellen Mäusen der Fall ist.

4.3 Der Einfluss von intestinalen Bakterien auf die Expression der antimikrobiellen Peptide Elafin und HBD2

Ein weiterer Teil dieser Arbeit fokussierte sich auf die Frage, ob die Expression der AMPs Elafin und HBD2 durch Bakterien in dem etablierten LS174T *in vitro* System beeinflusst wird. Dabei induzierten Eck12 und EcN, gefolgt von Symbioflor G2, stark die Expression der beiden AMPs. In der Arbeitsgruppe um Wehkamp wurde bereits ein induzierender Effekt verschiedener probiotischer Bakterien, unter anderem eine sehr starke Induktion durch EcN, auf die HBD2-Expression in Caco2 Zellen gezeigt (Wehkamp et al., 2004b). Dabei hatte Eck12 im Unterschied zu den Ergebnissen in LS174T Zellen nur einen geringen Effekt auf die HBD2-Expression. *L. fermentum* hingegen induzierte HBD2 in Caco2 Zellen, aber nicht in LS174T Zellen. Damit scheint die HBD2-Expression in verschiedenen Zelllinien unterschiedlich reguliert zu werden. Inwieweit dies zum Beispiel an einer unterschiedlichen PRR Signatur und Signalweitergebung liegen kann, könnte in weiteren Untersuchungen aufgeklärt werden.

Es gibt bereits viele Studien, welche die Induktion sowohl von Elafin als auch von HBD2 durch verschiedene Keime in unterschiedlichen Zelltypen zeigten. So führte zum Beispiel die Infektion von Epithelzellen des Ovars mit *Chlamydia trachomatis* zur Induktion von Elafin (King et al., 2009). Auch *Pseudomonas aeruginosa* bzw. Mediumüberstände des Bakteriums konnte die Elafin-Expression in einer Lungenepithelzelllinie (Li et al., 2010), in humanen Keratinozyten (Meyer-Hoffert et al., 2003) und in T-Leukozyten induzieren (Marischen et al., 2009). In den mit *Porphyromonas gingivalis*-Überstand behandelten humanen primären Zahnfleischepithelzellen wurde Elafin ebenfalls induziert (Yin et al., 2010). Außer durch EcN in Caco2 Zellen (Schlee et al., 2007; Wehkamp et al., 2004b) wurde HBD2 auch von *Staphylococcus epidermidis* in humanen Keratinozyten (Ommori et al., 2013), von *Salmonella enteritidis* Flagellin in Caco2 Zellen (Ogushi et al., 2001) und von *H. pylori* in einer Magenkarzinomzelllinie (Wada et al., 2001) induziert.

Es ist meines Wissens in dieser Arbeit erstmals beschrieben, dass Elafin von EcN induziert wird. Elafin, welches neben seiner Rolle als Antiprotease auch antimikrobielle Eigenschaften hat, ist zusammen mit anderen AMPs wie HBD2 ein wichtiger Bestandteil der mukosalen Barriere (Motta et al., 2011). Dabei ist seine entzündungsbedingte Induktion im Dickdarm-Crohn ähnlich wie bei HBD2 (Wehkamp et al., 2002) vermindert, was zur Schwächung der Barrierefunktion beitragen und den intestinalen Keimen das Vordringen zum Epithel erleichtert könnte (Schmid et al., 2007). Das probiotische Bakterium EcN wurde bereits erfolgreich bei einigen intestinalen Erkrankungen wie Reizdarmsyndrom (Kruis et al., 2012) und Diarrhö eingesetzt (Henker et al., 2007), ebenso bei CU, wo es zu einer Verlängerung der Remissionsphase führt (Kruis et al., 2004). Neben anderen für den Wirt vorteilhaften Charakteristika wie anti-inflammatorischen Eigenschaften und dem Fehlen von Virulenzfaktoren (Trebichavsky et al., 2010), trägt EcN durch seine Fähigkeit HBD2 zu induzieren zu einer starken intestinalen Barriere bei (Möndel et al., 2009). So ist es möglich, dass EcN über eine Induktion von Elafin die Widerstandsfähigkeit der mukosalen Barriere zusätzlich steigert.

4.4 Das Flagellin von *E. coli* Nissle ist über TLR5 in die Regulation von Hes1, Hath1, Muc1, Elafin und HBD2 involviert

Im Rahmen dieser Studie konnte gezeigt werden, dass durch die Behandlung von LS174T Zellen mit EcN die Expression von Hes1, Hath1 und KLF4 herunterreguliert und von Muc1, Elafin und HBD2 induziert wird. Des Weiteren sollten der regulierende Faktor des EcN und die zugrunde liegenden molekularen Mechanismen der EcN-Effekte untersucht werden.

In einer vorhergehenden Studie von Schlee *et al.* konnte gezeigt werden, dass HBD2 in Caco2 Zellen von EcN über Flagellin induziert wird (Schlee et al., 2007). Diese Tatsache und die Beobachtung, dass die EcN-Effekte auf Hes1, Hath1, Muc1 und Elafin zu etwa derselben Zeit wie die HBD2-Induktion stattfanden, ließen die Vermutung zu, dass auch den Effekten auf Hes1, Hath1, Muc1 und Elafin derselbe Mechanismus zu Grunde liegen könnte. Durch den Einsatz von mutierten EcN-Stämmen mit Deletionen in den Genen, welche die Ausbildung von Flagelle steuern, konnte zum ersten Mal gezeigt werden, dass die EcN-Flagelle auch an der EcN-bedingten Regulation von Hes1, Hath1, Muc1 und Elafin in intestinalen Epithelzellen wesentlich beteiligt ist.

Die Flagelle, ein fadenförmiger Fortsatz, welcher dem Bakterium zur Fortbewegung dient, ist zum größten Teil aus dem hoch konservierten Protein Flagellin aufgebaut (Iino, 1969). Flagellin ist dafür bekannt, ein potenter Aktivator der angeborenen Immunantwort zu sein, was sich zum Beispiel durch die Expression pro-inflammatorischer Zytokine oder anderer Abwehrfaktoren wie antimikrobieller Peptide äußert (Ramos et al., 2004; Schlee et al., 2007; Zeng et al., 2006). Aber auch die adaptive Immunantwort, wie Aktivierung der CD4⁺ T-Zellen und anschließende Ausschüttung von INF- γ , kann von Flagellin ausgelöst werden (McSorley et al., 2000). Die Flagelle dient auch zur Adhäsion des Bakteriums an die Zelloberfläche oder am Mukus. Dadurch wird sowohl symbiotischen Bakterien wie *EcN* (Troge et al., 2012), aber auch pathogenen Keimen wie *EPEC* (*enteropathogene E. coli*) (Erdem et al., 2007) und *Salmonella enterica* (Allen-Vercoe and Woodward, 1999) die Kolonisation der Darmwand erleichtert. Das bakterielle Flagellin kann von Wirtszellen hauptsächlich auf zwei Wegen erkannt werden. Flagellin, welches in das Cytosol gelangt ist, wird von den intrazellulären Rezeptoren NLRC4 (auch IPAF genannt) oder Naip5 gebunden. Beide gehören zur Familie der NOD-like Rezeptoren und lösen nach der Bindung an Flagellin eine Aktivierung von Caspase-1 und die Induktion von Zytokinen aus (Miao et al., 2006; Roy and Zamboni, 2006). Extrazelluläres Flagellin wird von TLR5 gebunden, welches in den Epithelzellen auf der extrazellulären Seite der basolateralen Membran funktionell exprimiert wird (Gewirtz et al., 2001). Eine Bindung von Flagellinmonomeren an TLR5 hat eine Aktivierung der MyD88 vermittelten NF κ B- und MAPK-Signalkaskade zur Folge, welche eine proinflammatorische Immunantwort auslösen kann (Gewirtz et al., 2001; Yu et al., 2003). Flagellin wird sowohl von kommensalen als auch von pathogenen Bakterien exprimiert. Auf Grund der hohen Konservierung kann sowohl das von kommensalen als auch das von pathogenen Keimen isolierte Flagellin eine pro-inflammatorische Antwort auslösen. Dabei induziert Flagellin nur dann eine Immunreaktion, wenn es die Epithelschicht durchquert und Kontakt zu der basolateralen Membran hat, wo TLR5 exprimiert wird. Deswegen löst das im Darmlumen sezernierte Flagellin in einem intakten Epithel zunächst keine Entzündung aus. Erst wenn die Barriere geschwächt ist, können kommensale Bakterien ins Epithel vordringen, über Flagellin an TLR5 binden und eine Entzündung auslösen (Gewirtz et al., 2001).

In Tierversuchen wurde eine wichtige protektive Rolle von TLR5 gezeigt. So führte das Ausknocken des TLR5-Gens bei der Mehrheit der Mäuse zu einer spontanen Colitis. Dabei wurden bei TLR5-knockout-Tieren, ähnlich wie bei CED- und Kolonkarzinompatienten

(Swidsinski et al., 2002), vermehrt adhäsive Bakterien am Darmepithel gefunden (Vijay-Kumar et al., 2007). Interessanterweise scheint im Menschen eine dominant-negative Mutation im TLR5-Gen, welche zu einer schwächeren Aktivierung der NFκB-Signalkaskade führt, protektiv bei MC zu sein. Da die Ursachen für CED multifaktoriellen Charakters sind, könnte eine Kombination aus Barrieredefekten und der vollen TLR5 Funktion ein höheres Risiko für die Entstehung einer chronischen Entzündungssymptomatik darstellen (Gewirtz et al., 2006). Auch weitere Studien haben die Assoziation von TLR5 aber auch von anderen TLRs mit CED untersucht. Bei aktiver CU war die Expression von TLR2, TLR4, TLR8 und TLR9 signifikant und die von TLR5 tendenziell erhöht, wobei die Expression dieser TLRs mit dem Entzündungsgrad und der Expression von pro-inflammatorischen Zytokinen IL-6 und TNFα korrelierte (Sánchez-Muñoz et al., 2011). In einer anderen Studie war die Expression von TLR3 bei aktivem MC, nicht aber bei CU herunter reguliert. TLR4 war dagegen sowohl bei MC als auch bei CU induziert, während TLR5 unverändert war (Cario and Podolsky, 2000). In der Mukosa von Pouchitis-Patienten war die Expression von TLR3 erniedrigt, wobei die von TLR5 erhöht war (Heuschen et al., 2007).

In dieser Arbeit konnte nun durch gezieltes Blocken von TLR5 in LS174T Zellen gezeigt werden, dass dieser PRR in die EcN-vermittelte Inhibierung von Hes1 und Hath1 sowie in die Induktion von Muc1, Elafin und HBD2 involviert ist. Die Involvierung von TLR5 in die EcN-bedingte Regulation von Hes1, Hath1, Muc1, Elafin und HBD2 könnte auch erklären, warum die EcN-Effekte nach 12 bis 24h abnehmen. Es ist möglich, dass mit zunehmender Zelldichte die basolaterale Membran der Zellen schlechter zugänglich ist und deswegen TLR5 nicht mehr aktiviert werden kann. Zudem könnte auch eine Desensibilisierung des Signalwegs oder eine Herunterregulierung von TLR5 durch negative Rückkopplung eine Rolle spielen. So ist zum Beispiel beschrieben, dass Muc1 die Flagellin-vermittelte TLR5/MyD88-Assoziation und die anschließende Aktivierung der NFκB-Signalkaskade inhibieren kann (Kato et al., 2007). Welche Mechanismen jedoch genau beteiligt sind, kann nur durch weitere Experimente geklärt werden.

4.5 Die Rolle der NFkB-Signalkaskade in der Regulation von Hes1, Hath1, KLF4, Muc1, Muc2, Elafin und HBD2

Frühere Studien konnten zeigen, dass die Flagellin-abhängige Induktion von HBD2 über die NFkB-Signalkaskade vermittelt wird (Schlee et al., 2007). Auch andere Arbeiten demonstrierten die NFkB-Abhängigkeit der HBD2-Induktion durch verschiedene Stimulantien (Ju et al., 2012; O'Neil et al., 1999; Shao et al., 2012; Witthöft et al., 2005). Außerdem ist bekannt, dass die NFkB-Signalkaskade unter anderem über TLR5 aktiviert wird (Gewirtz et al., 2001; Tallant et al., 2004). Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Expression von Hes1 und Hath1 sowie Muc1 und Elafin zeitgleich über EcN-Flagellin reguliert wird. Basierend auf diesen Daten und früheren Erkenntnissen wurde in dieser Arbeit die Hypothese aufgestellt, dass EcN die Expression von Hes1 und Hath1 sowie Muc1 und Elafin ebenfalls über NFkB-Signalkaskade reguliert.

4.5.1 Die Rolle der NFkB-Signalkaskade in der Regulation von Hes1, Hath1 und KLF4

Interessanterweise war die basale Expression von Hes1 und Hath1 durch das Blocken der NFkB-Signalkaskade in den LS174T Zellen erniedrigt und verminderte nicht wie erwartet den EcN-Effekt. In früheren Studien wurde gezeigt, dass EcN-Flagellin in die HBD2-Induktion nicht nur über NFkB-Signalkaskade involviert ist, sondern auch über AP-1 (*activator protein 1*), p38 MAPK (*mitogen activated kinase p38*), JNK Kinase (*c-Jun amino terminal kinase*) und ERK (*extracellular signal regulated kinases*) vermittelte Signalgebungen (Schlee et al., 2007; Wehkamp et al., 2004b). So könnte es sein, dass EcN NFkB-unabhängig die Expression von Hes1 und Hath1 auch über ein oder mehrere andere Signalwege herunterreguliert. Die Auswirkung der NFkB-Blockade auf die KLF4-Expression wurde ebenfalls analysiert. Dabei hat sich ergeben, dass die Inkubation der LS174T Zellen mit den Blockern zu einer Induktion der KLF4-Expression führte.

In den NEMO-knockout-Mäusen waren alle drei Differenzierungsfaktoren im Kolon erniedrigt. Jedoch waren mHes1 und mKLF4 im Dünndarm nicht signifikant verändert, wobei Math1 auch im Ileum vermindert vorlag (Daten nicht gezeigt). Diese Beobachtung unterstreicht die Tatsache, dass Dünn- und Dickdarm zwei unterschiedliche Kompartimente mit eigenen Funktionen und regulatorischen Mechanismen sind. Auch die unterschiedliche Dichte und Zusammensetzung der Darmmikroorganismen im Dünn- und Dickdarm (Blaut and

Clavel, 2007) könnte bei diesen Unterschieden eine Rolle spielen. Interessant ist in diesem Zusammenhang auch die Tatsache, dass die NEMO-knockout-Mäuse im Dickdarm, aber nicht im Dünndarm eine Entzündung entwickelten (Nenci et al., 2007). Die Autoren vermuten eine verminderte Expression des antimikrobiellen BD3 (Maushomolog zu HBD2), welches über NFkB reguliert wird, als Ursache für die geschwächte mukosale Barriere und die Entzündung in diesem Modell. Da man im entzündeten Epithel des Dickdarms invasive Bakterien als Zeichen einer defekten mukosalen Barriere fand, ist dies eine durchaus plausible Erklärung. Zudem war das Epithel der NFkB-defizienten Mäuse zum Teil zerstört. Es könnte weiterhin vermutet werden, dass durch die Erniedrigung der Differenzierungsfaktoren das Epithel eine abgeschwächte Regenerationsfähigkeit aufweist, wodurch die Barrierefunktion zusätzlich geschwächt wird.

Das Notch-Zielgen Hes1 spielt bei der intestinalen Homöostase eine wichtige Rolle (van der Flier and Clevers, 2009). So führte zum Beispiel eine Notch-Blockade zu einer geschwächten Regeneration des intestinalen Epithels und einer Verschlimmerung der Entzündung in einem DSS-Colitismodell in der Maus (Okamoto et al., 2009). Es ist in zahlreichen Studien beschrieben, dass Notch/Hes1 über TLRs und die NFkB-Signalkaskade in verschiedenen Zelltypen und auf verschiedenen Ebenen induziert werden kann (Hertzog, 2008). Zum Beispiel hat eine Aktivierung von NFkB in T- und B-Lymphozyten die Expression des Notch-Liganden Jagged-1 induziert, wobei folglich Hes1 und andere Notch-Zielgene hochreguliert wurden (Bash et al., 1999; Moran et al., 2007). In der Arbeitsgruppe um Aguilera konnte gezeigt werden, dass IκBα durch die Bindung an die Promotorregion des Hes1-Gens dessen Transkription verhindert. Des Weiteren wurde festgestellt, dass nach der Aktivierung der NFkB-Kaskade in Mausfibroblasten durch TNFα-Behandlung IKK in den Zellkern wanderte und die Ablösung von IκBα vom Hes1-Promotor herbeiführte. Als Folge davon konnte Hes1 exprimiert werden (Aguilera et al., 2004). In einer Studie von Maier *et al.* wurde im Pankreas von NEMO-knockout-Mäusen eine verminderte Expression von Hes1 und KLF4 beobachtet, was unsere Daten im Darmgewebe passend komplementiert (Maier et al., 2013). Darüber hinaus konnte in einer Studie beobachtet werden, dass der KLF4-Promoter in primären Rattenkeratinozyten von NFkB-Heterodimeren p50 und p65 positiv reguliert wird (Kazumori et al., 2011). Die unterschiedliche Auswirkung der NFkB-Inhibition auf die Expression von KLF4 *in vivo* und *in vitro* könnte man so erklären, dass man Maus und Mensch nicht uneingeschränkt vergleichen kann. Außerdem sind im *in vivo* Modell viele Variablen im Spiel,

wie zum Beispiel der Einfluss von Immunzellen, welche die Mukosa infiltrieren und zahlreiche Zytokine und Chemokine exprimieren (Nishio and Honda, 2012). Während die Regulation von Hes1 sowie KLF4 über die NFkB-Signalkaskade bereits in anderen Zellarten beschrieben wurde, sind dies meines Wissens die ersten Daten, welche eine Regulation in intestinalen Zellen zeigen. Darüber hinaus konnte in dieser Arbeit zum ersten Mal ein regulatorischer Einfluss der NFkB-Signalkaskade auf die Hath1-Expression gezeigt werden.

Aus den *in vitro* und *in vivo* Daten kann man festhalten, dass in den intestinalen Epithelzellen die NFkB-Signalkaskade in die Regulation der Differenzierungsfaktoren Hes1, Hath1 und KLF4 involviert ist. Die Differenzierungsfaktoren Hes1, Hath1 und KLF4 sind bei intestinalen Erkrankungen wie CED (Gerseemann et al., 2009; Okamoto et al., 2009) und Krebs (Choi et al., 2006; Kazanjian and Shroyer, 2011; Leow et al., 2004) beteiligt. Bei der Pathogenese von CED und CAC spielt die NFkB-Signalkaskade eine zentrale Rolle (Atreya et al., 2008; Karin, 2009; Maeda and Omata, 2008). Auf Grund der Komplexität der Wechselwirkung zwischen den Signalwegen, welche sich Kontext-spezifisch und auf verschiedenen Ebenen beeinflussen, ist der Zusammenhang zwischen der NFkB-Signalkaskade und der Desregulation von Hes1, Hath1 und KLF4 in intestinalen Erkrankungen nicht eindeutig geklärt und benötigt weitere Untersuchungen.

4.5.2 Die Rolle der NFkB-Signalkaskade in der Regulation von Muc1, Muc2, Elafin und HBD2

Die Versuche mit den NFkB-Blockern haben ergeben, dass die NFkB-Signalkaskade in die EcN-vermittelte Muc1- und Elafin-Induktion in LS174T Zellen involviert ist. Auch die NFkB-abhängige HBD2-Induktion, welche bereits in früheren Arbeiten beschrieben wurde (Schlee et al., 2007; Wehkamp et al., 2004b), konnte in der Zelllinie LS174T bestätigt werden. Die Zytokin-vermittelte NFkB-Abhängigkeit der Elafin-Expression wurde bisher in Lungenepithelzellen gezeigt (Bingle et al., 2001), wobei die NFkB-abhängige Muc1-Induktion meines Wissens weder in Verbindung mit Bakterien noch mit anderen Stimulantien untersucht wurde.

In Mäusen mit einer Defizienz im NFkB-Signalweg (NEMO-knockout), spezifisch im intestinalen Epithel, war Muc1 im distalen Kolon stark inhibiert. Die Muc2-Expression war

hingegen zwar erniedrigt, dieser Effekt war aber aufgrund der hohen interindividuellen Variation nicht signifikant. Die Arbeitsgruppe um Pasparakis, welche das Mausgewebe für diese Arbeit zur Verfügung stellte, hat in einer Studie von Nenci *et al.* einen Verlust der Becherzellen in den NEMO-knockout-Mäusen festgestellt, was die Verminderung der Muc2-Expression erklären könnte. Nenci *et al.* fanden ebenfalls heraus, dass die Expression aller bekannter Cryptidine (α -Defensine der Maus) in den NFkB-defizienten Mäusen nur im Alter von 2 Wochen herunterreguliert waren, wobei BD3 auch im fortgeschrittenen Alter stark vermindert war (Nenci et al., 2007). Die Ergebnisse dieser Studie geben einen Hinweis auf einen weiteren Zusammenhang zwischen der Entzündung und der Modulation der intestinalen Barriere.

4.6 Schlussfolgerung und Ausblick

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass bestimmte intestinale Bakterien, insbesondere der Laborstamm Eck12 und der probiotische EcN verschiedene Elemente der mukosalen Barriere beeinflussen. In der kolonalen Adenokarzinomazelllinie LS174T konnten einige Bakterien die Expression der Differenzierungsfaktoren Hes1, Hath1 und KLF4 herunterregulieren, sowie das Mucin Muc1, aber auch die AMPs Elafin und HBD2 induzieren. Darüber hinaus ergab der Vergleich von keimfreien vs. SPF besiedelten Mäusen, dass die kommensale Mikrobiota in ihrer Gesamtheit die Expression von Hes1, Hath1 und KLF4 im Kolon ebenfalls herunterreguliert. Diese Erkenntnis könnte zum Verständnis der Zusammenwirkung von Wirt und Mikrobiota in der Entwicklung und Funktion des Gastrointestinaltraktes, aber auch hinsichtlich der Entstehung bestimmter intestinaler Erkrankungen beitragen. Sowohl die CED (Gersemann et al., 2009; Zheng et al., 2011) als auch die Entstehung von Kolonkarzinomen sind mit einer Dysregulation der Differenzierungsfaktoren Hes1, Hath1 und KLF4 assoziiert (Choi et al., 2006; Kazanjian and Shroyer, 2011). Beide Erkrankungen stehen mit mukosa-assoziierten Bakterien und bakterieller Dysbiose in Verbindung. Zudem werden auch ganz bestimmte Keime mit CED oder gastrointestinalen Karzinomen in Verbindung gebracht (Marteau and Chaput, 2011). Die Erkenntnis, dass die Differenzierungsfaktoren Hes1, Hath1 und KLF4 von bestimmten Mikroorganismen reguliert werden, schafft Raum für Spekulation, ob die adhärennten kommensalen oder die spezifischen, mit CED assoziierten Keime durch Manipulation der Expression dieser Faktoren zur Pathogenese beitragen. Beispielsweise wurde für das mit der

Entstehung von Magenkarzinomen assoziierte *H. pylori* vor kurzem gezeigt, dass es die Hes1-Expression in gastrischen Epithelzellen inhibiert und die Hath1-Expression induziert (Zhang et al., 2012). Auch weiß man, dass die Wnt-Signalkaskade, welche in der Epithelhomöostase (Crosnier et al., 2006) sowie CED-Pathogenese (Koslowski et al., 2009, 2012) und Krebsentstehung eine wichtige Rolle spielt (Peignon et al., 2011), bakteriell reguliert wird (Sun et al., 2004). Es wäre eine äußerst interessante Fragestellung, ob die mit CED oder intestinalen Karzinomen assoziierten Keime, einzeln oder in Kombination, in den intestinalen Epithelzellen in beispielsweise gnotobiotischen Tierstudien einen Einfluss auf die Expression der Differenzierungsfaktoren haben. Auch wäre es spannend zu untersuchen, ob probiotische Stämme wie EcN in monoassoziierten Mäusen oder in tierischen Colitis- und Tumormodellen bestimmte Differenzierungsfaktoren regulieren. Des Weiteren wäre es sinnvoll beispielsweise durch Mikroarrays weitere für die epitheliale Homöostase und Differenzierung relevante Signalmoleküle in die Untersuchungen einzuschließen.

In den *in vitro* Experimenten lag der Fokus dieser Arbeit vor allem auf den regulatorischen Effekten und Wirkungsmechanismen des probiotischen EcN. Bisher lag das Augenmerk der Probiotikaforschung vor allem auf den immunmodulatorischen Eigenschaften (Matthes et al., 2010; Trebichavsky et al., 2010; Ukena et al., 2005). Das Aufklären der Mechanismen, mit welchen die probiotischen Keime in grundlegende Prozesse des intestinalen Epithels wie Differentiation und Regeneration eingreifen, könnte zum besseren Verstehen und Vorhersagen der probiotischen Wirkung auf den Wirt beitragen. Zudem könnte es dabei helfen, weitere Indikationsgebiete zu identifizieren. In dieser Arbeit konnte nun zum ersten Mal gezeigt werden, dass Hes1, Hath1 bzw. Muc1 und Elafin in intestinalen Epithelzellen über EcN-Flagellin reguliert werden.

Interessanterweise führte die Inkubation mit flagellinlosem *E. coli* Symbioflor G2 ebenfalls zur Verminderung der Hes1-Expression. Außerdem induzierten Symbioflor G2 und die ebenfalls nicht motilen Bifidobakterien *B. breve* und *B. adolescentis* die Expression von Muc1, HBD2 und Elafin, wenn auch nicht in dem Maße wie EcN. Auch die *Lactobacillen*, welche ebenfalls keine Flagellen ausbilden, induzierten Muc1, aber nicht HBD2 und Elafin. In einer systematischen Studie könnte man der Frage nachgehen, welche weiteren MAMPs über welche PRRs und Mechanismen Hes1, Hath1, Muc1, Elafin und HBD2 regulieren.

Weiterhin konnte die regulatorische Bedeutung von Flagellin bestätigt werden, indem die Involvierung des Flagellin-Rezeptor TLR5 in die Regulation von Hes1, Hath1, Muc1, Elafin und HBD2 gezeigt wurde. Eine weitere künftige Studie könnte zudem die Rolle von TLR5 *in vivo*, zum Beispiel im TLR5-knockout-Mausmodell, untersuchen. TLR5-knockout-Tiere, ähnlich wie auch die NEMO-knockout-Mäuse, entwickeln eine spontane Colitis (Vijay-Kumar et al., 2007). Es wäre spannend zu untersuchen, ob auch die Expression von Hes1, Hath1 und KLF4 bei TLR5-Defizienz verändert sein könnte.

Im Gegensatz zu Muc1, Elafin und HBD2 konnte kein Zusammenhang zwischen der EcN-bedingten Hes1- und Hath1-Regulation und der NFkB-Signalkaskade nachgewiesen werden. Das könnte daran liegen, dass nach der Bindung des Flagellinmonomers an TLR5 auch weitere Signalmoleküle wie JNK, ERK 1/2, p38 aber auch PI3K-Akt vermittelte Reaktionsketten eingeleitet werden können (Choi et al., 2010; Rhee et al., 2006). So wird die HBD2-Expression nicht exklusiv über die NFkB-Signalkaskade, sondern auch über p38, JNK und ERK reguliert (Ju et al., 2012; Shao et al., 2012; Wehkamp et al., 2004b). Es wäre interessant zu untersuchen, ob EcN-Flagellin und eventuell noch andere MAMPs über weitere TLRs die Expression von Hes1 und Hath1 über einen oder mehrere dieser Signalmoleküle reguliert.

Eine zukünftige Studie könnte sich mit der interessanten Frage beschäftigen, ob Muc1 einen Einfluss auf die Regulation von Hes1, Hath1, KLF4, Elafin und HBD2 hat. Das membranständige Mucin Muc1 ist nicht nur ein Bestandteil der Glykokalyx, sondern kann auch in bestimmte Signalwege wie Wnt und damit in viele intrazelluläre Prozesse wie Proliferation und Differenzierung eingreifen (Carson, 2008). Auch die Flagellin/TLR5-vermittelte NFkB-Signalkaskade wird von Muc1 gehemmt (Kato et al., 2007; Ueno et al., 2008). So ergibt sich die Fragestellung, ob Muc1 auch die Expression der untersuchten Faktoren beeinflusst und zum Beispiel über die Hemmung von TLR5/NFkB-Signalgebung die EcN-vermittelte Elafin und HBD2-Induktion inhibieren kann. Die Expression von Muc1 ist bei CED und vielen Krebsarten erhöht. Es wäre möglich, dass Muc1 durch seine Fähigkeit, in die molekularen Mechanismen des intestinalen Epithels einzugreifen, die Pathogenese bestimmter intestinaler Erkrankungen beeinflusst.

Ein weiterer interessanter Aspekt dieser Arbeit ist die allgemeine Beteiligung der NFkB-Signalkaskade an der Genregulation von Hes1, Hath1 und KLF4. Sowohl in den humanen

Kolonadenokarzinomazellen LS174T als auch im Mauskolon scheint die Expression von Hes1 und Hath1 abhängig von der NFkB-Signalkaskade zu sein. KLF4 dagegen wurde in den *in vitro* Versuchen durch die NFkB-Blockade induziert, jedoch *in vivo* inhibiert. Dass die Notch und NFkB-Signalkaskaden sich gegenseitig beeinflussen, ist schon relativ intensiv erforscht (Aguilera et al., 2004; Bash et al., 1999; Hertzog, 2008; Moran et al., 2007). Dass jedoch auch Hath1 NFkB-abhängig reguliert wird, ist eine neue Erkenntnis. Es wäre daher vielversprechend, die Beziehung von Hath1 und NFkB-Signalgebung weiter zu untersuchen. Die NFkB-Signalkaskade spielt bei der Initiierung und dem Verlauf der Entzündungsprozesse in verschiedenen Zelltypen eine essentielle Rolle (Tak and Firestein, 2001). Auch Proliferation, Differenzierung und Apoptose werden von NFkB reguliert, wobei die genauen Mechanismen noch nicht vollständig verstanden werden (Guttridge et al., 1999). Wie schon oben erwähnt, sind die epithelialen Differenzierungsfaktoren Hes1, Hath1 und KLF4 im Darm bei CED (Gersemann et al., 2009; Zheng et al., 2011) und Kolonkrebs (Choi et al., 2006; Kazanjian and Shroyer, 2011; Leow et al., 2004) dereguliert. Das weitere Aufklären der darin involvierten Mechanismen könnte dazu beitragen, besser zu verstehen wie eine Entzündung die Regeneration des Epithels beeinflusst. Auch weitere Details, die der Entstehung des entzündungsbedingten Karzinoms zugrunde liegen, könnten durch solche Untersuchungen aufgeklärt werden.

Abschließend kann man sagen, dass die hier präsentierte Arbeit einen Denkanstoß für zahlreiche weitere Fragestellungen bietet und dazu beiträgt, das komplexe Zusammenspiel von Mikrobiota, epithelialer Differenzierung und der Pathogenese von intestinalen Erkrankungen wie CED und Krebs besser zu verstehen.

Literaturverzeichnis

Abdulmir, A.S., Hafidh, R.R., and Abu Bakar, F. (2011). The association of *Streptococcus bovis/gallolyticus* with colorectal tumors: the nature and the underlying mechanisms of its etiological role. *J. Exp. Clin. Cancer Res. CR* 30, 11.

Allen, A., Pearson, J.P. (1993). Mucus glycoproteins of the normal gastrointestinal tract. *Eur. J. Gastroenterol. Amp Hepatol.* 5, 193–199.

Aguilera, C., Hoya-Arias, R., Haegeman, G., Espinosa, L., and Bigas, A. (2004). Recruitment of IkappaBalpha to the hes1 promoter is associated with transcriptional repression. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101, 16537–16542.

Ahmad, R., Raina, D., Trivedi, V., Ren, J., Rajabi, H., Kharbanda, S., and Kufe, D. (2007). MUC1 oncoprotein activates the IkappaB kinase beta complex and constitutive NF-kappaB signalling. *Nat. Cell Biol.* 9, 1419–1427.

Akira, S., Uematsu, S., and Takeuchi, O. (2006). Pathogen recognition and innate immunity. *Cell* 124, 783–801.

Allen, A., and Flemström, G. (2005). Gastroduodenal mucus bicarbonate barrier: protection against acid and pepsin. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 288, C1–19.

Allen-Vercoe, E., and Woodward, M.J. (1999). The role of flagella, but not fimbriae, in the adherence of *Salmonella enterica* serotype Enteritidis to chick gut explant. *J. Med. Microbiol.* 48, 771–780.

Allison, M.J., Cook, H.M., Milne, D.B., Gallagher, S., and Clayman, R.V. (1986). Oxalate degradation by gastrointestinal bacteria from humans. *J. Nutr.* 116, 455–460.

Andreu, P., Peignon, G., Slomianny, C., Taketo, M.M., Colnot, S., Robine, S., Lamarque, D., Laurent-Puig, P., Perret, C., and Romagnolo, B. (2008). A genetic study of the role of the Wnt/beta-catenin signalling in Paneth cell differentiation. *Dev. Biol.* 324, 288–296.

Antoni, L., Nuding, S., Weller, D., Gersemann, M., Ott, G., Wehkamp, J., and Stange, E.F. (2013). Human colonic mucus is a reservoir for antimicrobial peptides. *J. Crohns Colitis.*

Atreya, I., Atreya, R., and Neurath, M.F. (2008). NF-kappaB in inflammatory bowel disease. *J. Intern. Med.* 263, 591–596.

Baldus, S.E., Mönig, S.P., Huxel, S., Landsberg, S., Hanisch, F.-G., Engelmann, K., Schneider, P.M., Thiele, J., Hölscher, A.H., and Dienes, H.P. (2004). MUC1 and nuclear beta-catenin are coexpressed at the invasion front of colorectal carcinomas and are both correlated with tumor prognosis. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* 10, 2790–2796.

Bals, R., Wang, X., Wu, Z., Freeman, T., Bafna, V., Zasloff, M., and Wilson, J.M. (1998). Human beta-defensin 2 is a salt-sensitive peptide antibiotic expressed in human lung. *J. Clin. Invest.* 102, 874–880.

- Bash, J., Zong, W.X., Banga, S., Rivera, A., Ballard, D.W., Ron, Y., and G  linas, C. (1999). Rel/NF-kappaB can trigger the Notch signaling pathway by inducing the expression of Jagged1, a ligand for Notch receptors. *EMBO J.* 18, 2803–2811.
- Bergstr  m, A., Kristensen, M.B., Bahl, M.I., Metzdorff, S.B., Fink, L.N., Fr  kiaer, H., and Licht, T.R. (2012). Nature of bacterial colonization influences transcription of mucin genes in mice during the first week of life. *BMC Res. Notes* 5, 402.
- Le Berre, N., Heresbach, D., Kerbaol, M., Caulet, S., Bretagne, J.F., Chaperon, J., Gosselin, M., and Ram  e, M.P. (1995). Histological discrimination of idiopathic inflammatory bowel disease from other types of colitis. *J. Clin. Pathol.* 48, 749–753.
- Bevins, C.L., and Salzman, N.H. (2011). Paneth cells, antimicrobial peptides and maintenance of intestinal homeostasis. *Nat. Rev. Microbiol.* 9, 356–368.
- Bevins, C.L., Martin-Porter, E., and Ganz, T. (1999). Defensins and innate host defence of the gastrointestinal tract. *Gut* 45, 911–915.
- Bingle, L., Tetley, T.D., and Bingle, C.D. (2001). Cytokine-mediated induction of the human elafin gene in pulmonary epithelial cells is regulated by nuclear factor-kappaB. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 25, 84–91.
- Blaut, M., and Clavel, T. (2007). Metabolic diversity of the intestinal microbiota: implications for health and disease. *J. Nutr.* 137, 751S–5S.
- Boltin, D., Perets, T.T., Vilkin, A., and Niv, Y. (2013). Mucin function in inflammatory bowel disease: an update. *J. Clin. Gastroenterol.* 47, 106–111.
- Boman, H.G. (1995). Peptide antibiotics and their role in innate immunity. *Annu. Rev. Immunol.* 13, 61–92.
- Burns, A.J., and Rowland, I.R. (2000). Anti-carcinogenicity of probiotics and prebiotics. *Curr. Issues Intest. Microbiol.* 1, 13–24.
- Bustos, D., Negri, G., De Paula, J.A., Di Carlo, M., Yapur, V., Facente, A., and De Paula, A. (1998). Colonic proteinases: increased activity in patients with ulcerative colitis. *Medicina (Mex.)* 58, 262–264.
- Byrd, J.C., Yunker, C.K., Xu, Q.S., Sternberg, L.R., and Bresalier, R.S. (2000). Inhibition of gastric mucin synthesis by *Helicobacter pylori*. *Gastroenterology* 118, 1072–1079.
- Caballero-Franco, C., Keller, K., De Simone, C., and Chadee, K. (2007). The VSL#3 probiotic formula induces mucin gene expression and secretion in colonic epithelial cells. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 292, G315–322.
- Cario, E., and Podolsky, D.K. (2000). Differential alteration in intestinal epithelial cell expression of toll-like receptor 3 (TLR3) and TLR4 in inflammatory bowel disease. *Infect. Immun.* 68, 7010–7017.
- Carlson, M.E., and Conboy, I.M. (2007). Regulating the Notch pathway in embryonic, adult and old stem cells. *Curr. Opin. Pharmacol.* 7, 303–309.

- Carson, D.D. (2008). The cytoplasmic tail of MUC1: a very busy place. *Sci. Signal.* *1*, pe35.
- Cheng, H., and Leblond, C.P. (1974). Origin, differentiation and renewal of the four main epithelial cell types in the mouse small intestine V. Unitarian theory of the origin of the four epithelial cell types. *Am. J. Anat.* *141*, 537–561.
- Chillakuri, C.R., Sheppard, D., Lea, S.M., and Handford, P.A. (2012). Notch receptor-ligand binding and activation: insights from molecular studies. *Semin. Cell Dev. Biol.* *23*, 421–428.
- Choi, B.J., Cho, Y.G., Song, J.W., Kim, C.J., Kim, S.Y., Nam, S.W., Yoo, N.J., Lee, J.Y., and Park, W.S. (2006). Altered expression of the KLF4 in colorectal cancers. *Pathol. Res. Pract.* *202*, 585–589.
- Choi, Y.J., Im, E., Chung, H.K., Pothoulakis, C., and Rhee, S.H. (2010). TRIF mediates Toll-like receptor 5-induced signaling in intestinal epithelial cells. *J. Biol. Chem.* *285*, 37570–37578.
- Clamp, J.R., Fraser, G., and Read, A.E. (1981). Study of the carbohydrate content of mucus glycoproteins from normal and diseased colons. *Clin. Sci. Lond. Engl.* *1979* *61*, 229–234.
- Collier, J.R., Monk, N.A., Maini, P.K., and Lewis, J.H. (1996). Pattern formation by lateral inhibition with feedback: a mathematical model of delta-notch intercellular signalling. *J. Theor. Biol.* *183*, 429–446.
- Comelli, E.M., Simmering, R., Faure, M., Donnicola, D., Mansourian, R., Rochat, F., Cortesy-Theulaz, I., and Cherbut, C. (2008). Multifaceted transcriptional regulation of the murine intestinal mucus layer by endogenous microbiota. *Genomics* *91*, 70–77.
- Coussens, L.M., and Werb, Z. (2002). Inflammation and cancer. *Nature* *420*, 860–867.
- Croix, J.A., Bhatia, S., and Gaskins, H.R. (2011). Inflammatory cues modulate the expression of secretory product genes, Golgi sulfotransferases and sulfomucin production in LS174T cells. *Exp. Biol. Med.* *Maywood NJ* *236*, 1402–1412.
- Crosnier, C., Stamataki, D., and Lewis, J. (2006). Organizing cell renewal in the intestine: stem cells, signals and combinatorial control. *Nat. Rev. Genet.* *7*, 349–359.
- D’Haens, G.R., Geboes, K., Peeters, M., Baert, F., Penninckx, F., and Rutgeerts, P. (1998). Early lesions of recurrent Crohn’s disease caused by infusion of intestinal contents in excluded ileum. *Gastroenterology* *114*, 262–267.
- Darfeuille-Michaud, A., Boudeau, J., Bulois, P., Neut, C., Glasser, A.-L., Barnich, N., Bringer, M.-A., Swidsinski, A., Beaugerie, L., and Colombel, J.-F. (2004). High prevalence of adherent-invasive *Escherichia coli* associated with ileal mucosa in Crohn’s disease. *Gastroenterology* *127*, 412–421.
- Dekker, J., Rossen, J.W.A., Büller, H.A., and Einerhand, A.W.C. (2002). The MUC family: an obituary. *Trends Biochem. Sci.* *27*, 126–131.
- Van Den Brink, G.R., de Santa Barbara, P., and Roberts, D.J. (2001). Development. Epithelial cell differentiation--a Mather of choice. *Science* *294*, 2115–2116.

Deplancke, B., and Gaskins, H.R. (2001). Microbial modulation of innate defense: goblet cells and the intestinal mucus layer. *Am. J. Clin. Nutr.* **73**, 1131S–1141S.

Dianda, L., Hanby, A.M., Wright, N.A., Sebesteny, A., Hayday, A.C., and Owen, M.J. (1997). T cell receptor-alpha beta-deficient mice fail to develop colitis in the absence of a microbial environment. *Am. J. Pathol.* **150**, 91–97.

Didierlaurent, A., Sirard, J.-C., Kraehenbuhl, J.-P., and Neutra, M.R. (2002). How the gut senses its content. *Cell. Microbiol.* **4**, 61–72.

Dominguez-Bello, M.G., Costello, E.K., Contreras, M., Magris, M., Hidalgo, G., Fierer, N., and Knight, R. (2010). Delivery mode shapes the acquisition and structure of the initial microbiota across multiple body habitats in newborns. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **107**, 11971–11975.

Dorofeyev, A.E., Vasilenko, I.V., Rassokhina, O.A., and Kondratiuk, R.B. (2013). Mucosal barrier in ulcerative colitis and Crohn's disease. *Gastroenterol. Res. Pr.* **2013**, 431231.

Duchmann, R., Kaiser, I., Hermann, E., Mayet, W., Ewe, K., and Meyer zum Büschenfelde, K.H. (1995). Tolerance exists towards resident intestinal flora but is broken in active inflammatory bowel disease (IBD). *Clin. Exp. Immunol.* **102**, 448–455.

Erdem, A.L., Avelino, F., Xicohtencatl-Cortes, J., and Girón, J.A. (2007). Host protein binding and adhesive properties of H6 and H7 flagella of attaching and effacing *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **189**, 7426–7435.

Van Es, J.H., Jay, P., Gregorieff, A., van Gijn, M.E., Jonkheer, S., Hatzis, P., Thiele, A., van den Born, M., Begthel, H., Brabletz, T., et al. (2005). Wnt signalling induces maturation of Paneth cells in intestinal crypts. *Nat. Cell Biol.* **7**, 381–386.

Fahlgren, A., Hammarstrom, S., Danielsson, A., and Hammarstrom, M.-L. (2004). beta-Defensin-3 and -4 in intestinal epithelial cells display increased mRNA expression in ulcerative colitis. *Clin. Exp. Immunol.* **137**, 379–385.

Ferlay, J., Steliarova-Foucher, E., Lortet-Tieulent, J., Rosso, S., Coebergh, J.W.W., Comber, H., Forman, D., and Bray, F. (2013). Cancer incidence and mortality patterns in Europe: estimates for 40 countries in 2012. *Eur. J. Cancer Oxf. Engl.* **1990** **49**, 1374–1403.

Fiocchi, C. (1990). Immune events associated with inflammatory bowel disease. *Scand. J. Gastroenterol. Suppl.* **172**, 4–12.

Fiocchi, C. (1998). Inflammatory bowel disease: Etiology and pathogenesis. *Gastroenterology* **115**, 182–205.

Flentjar, N., Chu, P.-Y., Ng, A.Y.-N., Johnstone, C.N., Heath, J.K., Ernst, M., Hertzog, P.J., and Pritchard, M.A. (2007). TGF-betaRII rescues development of small intestinal epithelial cells in Elf3-deficient mice. *Gastroenterology* **132**, 1410–1419.

Van der Flier, L.G., and Clevers, H. (2009). Stem cells, self-renewal, and differentiation in the intestinal epithelium. *Annu. Rev. Physiol.* **71**, 241–260.

- Forman, D., Newell, D.G., Fullerton, F., Yarnell, J.W., Stacey, A.R., Wald, N., and Sitas, F. (1991). Association between infection with *Helicobacter pylori* and risk of gastric cancer: evidence from a prospective investigation. *BMJ* 302, 1302–1305.
- Frank, D.N., Robertson, C.E., Hamm, C.M., Kpadeh, Z., Zhang, T., Chen, H., Zhu, W., Sartor, R.B., Boedeker, E.C., Harpaz, N., et al. (2011). Disease phenotype and genotype are associated with shifts in intestinal-associated microbiota in inflammatory bowel diseases. *Inflamm. Bowel Dis.* 17, 179–184.
- Fre, S., Huyghe, M., Mourikis, P., Robine, S., Louvard, D., and Artavanis-Tsakonas, S. (2005). Notch signals control the fate of immature progenitor cells in the intestine. *Nature* 435, 964–968.
- Fukushima, K., Sasaki, I., Ogawa, H., Naito, H., Funayama, Y., and Matsuno, S. (1999). Colonization of microflora in mice: mucosal defense against luminal bacteria. *J. Gastroenterol.* 34, 54–60.
- Fukushima, K., Ogawa, H., Takahashi, K., Naito, H., Funayama, Y., Kitayama, T., Yonezawa, H., and Sasaki, I. (2003). Non-pathogenic bacteria modulate colonic epithelial gene expression in germ-free mice. *Scand. J. Gastroenterol.* 38, 626–634.
- Fuller, R. (1989). Probiotics in man and animals. *J. Appl. Bacteriol.* 66, 365–378.
- Furr, A.E., Ranganathan, S., and Finn, O.J. (2010). Aberrant expression of MUC1 mucin in pediatric inflammatory bowel disease. *Pediatr. Dev. Pathol. Off. J. Soc. Pediatr. Pathol. Paediatr. Pathol. Soc.* 13, 24–31.
- Furrie, E., Macfarlane, S., Kennedy, A., Cummings, J.H., Walsh, S.V., O'neil, D.A., and Macfarlane, G.T. (2005). Synbiotic therapy (*Bifidobacterium longum*/Synergy 1) initiates resolution of inflammation in patients with active ulcerative colitis: a randomised controlled pilot trial. *Gut* 54, 242–249.
- Gałecka, M., Szachta, P., Bartnicka, A., Łykowska-Szuber, L., Eder, P., and Schwiertz, A. (2013). *Faecalibacterium prausnitzii* and Crohn's disease - is there any connection? *Pol. J. Microbiol. Pol. Towar. Mikrobiol. Pol. Soc. Microbiol.* 62, 91–95.
- Ganz, T., Selsted, M.E., Szklarek, D., Harwig, S.S., Daher, K., Bainton, D.F., and Lehrer, R.I. (1985). Defensins. Natural peptide antibiotics of human neutrophils. *J. Clin. Invest.* 76, 1427–1435.
- Gerritsen, J., Smidt, H., Rijkers, G.T., and de Vos, W.M. (2011). Intestinal microbiota in human health and disease: the impact of probiotics. *Genes Nutr.* 6, 209–240.
- Gersemann, M., Becker, S., Kübler, I., Koslowski, M., Wang, G., Herrlinger, K.R., Griger, J., Fritz, P., Fellermann, K., Schwab, M., et al. (2009). Differences in goblet cell differentiation between Crohn's disease and ulcerative colitis. *Differ. Res. Biol. Divers.* 77, 84–94.
- Gersemann, M., Wehkamp, J., and Stange, E.F. (2012). Innate immune dysfunction in inflammatory bowel disease. *J. Intern. Med.* 271, 421–428.

Gewirtz, A.T., Navas, T.A., Lyons, S., Godowski, P.J., and Madara, J.L. (2001). Cutting edge: bacterial flagellin activates basolaterally expressed TLR5 to induce epithelial proinflammatory gene expression. *J. Immunol. Baltim. Md* 1950 167, 1882–1885.

Gewirtz, A.T., Vijay-Kumar, M., Brant, S.R., Duerr, R.H., Nicolae, D.L., and Cho, J.H. (2006). Dominant-negative TLR5 polymorphism reduces adaptive immune response to flagellin and negatively associates with Crohn's disease. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 290, G1157–1163.

Gnad, T., Feoktistova, M., Leverkus, M., Lendeckel, U., and Naumann, M. (2010). *Helicobacter pylori*-induced activation of beta-catenin involves low density lipoprotein receptor-related protein 6 and Dishevelled. *Mol. Cancer* 9, 31.

Gordon, J.I., Hooper, L.V., McNevin, M.S., Wong, M., and Bry, L. (1997). Epithelial cell growth and differentiation. III. Promoting diversity in the intestine: conversations between the microflora, epithelium, and diffuse GALT. *Am. J. Physiol.* 273, G565–570.

Gueimonde, M., Ouwehand, A., Huhtinen, H., Salminen, E., and Salminen, S. (2007). Qualitative and quantitative analyses of the bifidobacterial microbiota in the colonic mucosa of patients with colorectal cancer, diverticulitis and inflammatory bowel disease. *World J. Gastroenterol. WJG* 13, 3985–3989.

Guilmeau, S. (2012). Notch signaling and intestinal cancer. *Adv. Exp. Med. Biol.* 727, 272–288.

Guttridge, D.C., Albanese, C., Reuther, J.Y., Pestell, R.G., and Baldwin, A.S., Jr (1999). NF-kappaB controls cell growth and differentiation through transcriptional regulation of cyclin D1. *Mol. Cell. Biol.* 19, 5785–5799.

Hagggar, F.A., and Boushey, R.P. (2009). Colorectal Cancer Epidemiology: Incidence, Mortality, Survival, and Risk Factors. *Clin. Colon Rectal Surg.* 22, 191–197.

Hanski, C., Born, M., Foss, H.D., Marowski, B., Mansmann, U., Arastéh, K., Bachler, B., Papenfuss, M., and Niedobitek, F. (1999). Defective post-transcriptional processing of MUC2 mucin in ulcerative colitis and in Crohn's disease increases detectability of the MUC2 protein core. *J. Pathol.* 188, 304–311.

Hansson, G.C. (2012). Role of mucus layers in gut infection and inflammation. *Curr. Opin. Microbiol.* 15, 57–62.

Hansson, A., Marín, Y.E., Suh, J., Rabson, A.B., Chen, S., Huberman, E., Chang, R.L., Conney, A.H., and Zheng, X. (2005). Enhancement of TPA-induced growth inhibition and apoptosis in myeloid leukemia cells by BAY 11-7082, an NF-kappaB inhibitor. *Int. J. Oncol.* 27, 941–948.

Harder, J., Bartels, J., Christophers, E., and Schroder, J.M. (2001). Isolation and characterization of human beta -defensin-3, a novel human inducible peptide antibiotic. *J. Biol. Chem.* 276, 5707–5713.

Harder, J., Gläser, R., and Schröder, J.-M. (2007). Human antimicrobial proteins effectors of innate immunity. *J. Endotoxin Res.* 13, 317–338.

- Hayashi, H., Takahashi, R., Nishi, T., Sakamoto, M., and Benno, Y. (2005). Molecular analysis of jejunal, ileal, caecal and recto-sigmoidal human colonic microbiota using 16S rRNA gene libraries and terminal restriction fragment length polymorphism. *J. Med. Microbiol.* *54*, 1093–1101.
- Hegazy, S.K., and El-Bedewy, M.M. (2010). Effect of probiotics on pro-inflammatory cytokines and NF-kappaB activation in ulcerative colitis. *World J. Gastroenterol. WJG* *16*, 4145–4151.
- Henker, J., Laass, M., Blokhin, B.M., Bolbot, Y.K., Maydannik, V.G., Elze, M., Wolff, C., and Schulze, J. (2007). The probiotic *Escherichia coli* strain Nissle 1917 (EcN) stops acute diarrhoea in infants and toddlers. *Eur. J. Pediatr.* *166*, 311–318.
- Hertzog, P. (2008). A notch in the toll belt. *Immunity* *29*, 663–665.
- Heuschen, G., Leowardi, C., Hinz, U., Autschbach, F., Stallmach, A., Herfarth, C., and Heuschen, U.A. (2007). Differential expression of toll-like receptor 3 and 5 in ileal pouch mucosa of ulcerative colitis patients. *Int. J. Colorectal Dis.* *22*, 293–301.
- Hiemstra, P.S. (2002). Novel roles of protease inhibitors in infection and inflammation. *Biochem. Soc. Trans.* *30*, 116–120.
- Hill, M.J. (1997). Intestinal flora and endogenous vitamin synthesis. *Eur. J. Cancer Prev. Off. J. Eur. Cancer Prev. Organ. ECP 6 Suppl 1*, S43–45.
- Hoebe, K., Janssen, E., and Beutler, B. (2004). The interface between innate and adaptive immunity. *Nat. Immunol.* *5*, 971–974.
- Hoffman, J., Kuhnert, F., Davis, C.R., and Kuo, C.J. (2004). Wnts as essential growth factors for the adult small intestine and colon. *Cell Cycle Georget. Tex* *3*, 554–557.
- Hooper, L.V. (2004). Bacterial contributions to mammalian gut development. *Trends Microbiol.* *12*, 129–134.
- Hooper, L.V., and Gordon, J.I. (2001). Commensal host-bacterial relationships in the gut. *Science* *292*, 1115–1118.
- Hooper, L.V., Wong, M.H., Thelin, A., Hansson, L., Falk, P.G., and Gordon, J.I. (2001). Molecular analysis of commensal host-microbial relationships in the intestine. *Science* *291*, 881–884.
- Hooper, L.V., Midtvedt, T., and Gordon, J.I. (2002). How host-microbial interactions shape the nutrient environment of the mammalian intestine. *Annu. Rev. Nutr.* *22*, 283–307.
- Horm, T.M., and Schroeder, J.A. (2013). MUC1 and metastatic cancer: expression, function and therapeutic targeting. *Cell Adhes. Migr.* *7*, 187–198.
- Iino, T. (1969). Genetics and chemistry of bacterial flagella. *Bacteriol. Rev.* *33*, 454–475.

Ishikawa, K., Satoh, Y., Oomori, Y., Yamano, M., Matsuda, M., and Ono, K. (1989). Influence of conventionalization on cecal wall structure of germ-free Wistar rats: quantitative light and qualitative electron microscopic observations. *Anat. Embryol. (Berl.)* 180, 191–198.

Iwashita, J., Sato, Y., Sugaya, H., Takahashi, N., Sasaki, H., and Abe, T. (2003). mRNA of MUC2 is stimulated by IL-4, IL-13 or TNF-alpha through a mitogen-activated protein kinase pathway in human colon cancer cells. *Immunol. Cell Biol.* 81, 275–282.

Jaeger, S.U., Schroeder, B.O., Meyer-Hoffert, U., Courth, L., Fehr, S.N., Gersemann, M., Stange, E.F., and Wehkamp, J. (2013). Cell-mediated reduction of human β -defensin 1: a major role for mucosal thioredoxin. *Mucosal Immunol.*

Jäger, S., Stange, E.F., and Wehkamp, J. (2013). Inflammatory bowel disease: an impaired barrier disease. *Langenbecks Arch. Surg. Dtsch. Ges. Für Chir.* 398, 1–12.

Janeway, C. (2009). *Janeway Immunologie* (Heidelberg: Spektrum, Akad. Verl.).

Jenny, M., Uhl, C., Roche, C., Duluc, I., Guillermin, V., Guillemot, F., Jensen, J., Kedinger, M., and Gradwohl, G. (2002). Neurogenin3 is differentially required for endocrine cell fate specification in the intestinal and gastric epithelium. *EMBO J.* 21, 6338–6347.

Jensen, J., Pedersen, E.E., Galante, P., Hald, J., Heller, R.S., Ishibashi, M., Kageyama, R., Guillemot, F., Serup, P., and Madsen, O.D. (2000). Control of endodermal endocrine development by Hes-1. *Nat. Genet.* 24, 36–44.

Johansson, M.E.V., Phillipson, M., Petersson, J., Velcich, A., Holm, L., and Hansson, G.C. (2008). The inner of the two Muc2 mucin-dependent mucus layers in colon is devoid of bacteria. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 105, 15064–15069.

Johansson, M.E.V., Gustafsson, J.K., Holmén-Larsson, J., Jabbar, K.S., Xia, L., Xu, H., Ghishan, F.K., Carvalho, F.A., Gewirtz, A.T., Sjövall, H., et al. (2013). Bacteria penetrate the normally impenetrable inner colon mucus layer in both murine colitis models and patients with ulcerative colitis. *Gut.*

Jones, D.E., and Bevins, C.L. (1992). Paneth cells of the human small intestine express an antimicrobial peptide gene. *J. Biol. Chem.* 267, 23216–23225.

Ju, S.M., Goh, A.R., Kwon, D.-J., Youn, G.S., Kwon, H.-J., Bae, Y.S., Choi, S.Y., and Park, J. (2012). Extracellular HIV-1 Tat induces human beta-defensin-2 production via NF-kappaB/AP-1 dependent pathways in human B cells. *Mol. Cells* 33, 335–341.

Kandori, H., Hirayama, K., Takeda, M., and Doi, K. (1996). Histochemical, lectin-histochemical and morphometrical characteristics of intestinal goblet cells of germfree and conventional mice. *Exp. Anim. Jpn. Assoc. Lab. Anim. Sci.* 45, 155–160.

Kapoor, N., Narayana, Y., Patil, S.A., and Balaji, K.N. (2010). Nitric oxide is involved in *Mycobacterium bovis* bacillus Calmette-Guérin-activated Jagged1 and Notch1 signaling. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 184, 3117–3126.

Karin, M. (2009). NF-kappaB as a critical link between inflammation and cancer. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 1, a000141.

Kato, K., Lu, W., Kai, H., and Kim, K.C. (2007). Phosphoinositide 3-kinase is activated by MUC1 but not responsible for MUC1-induced suppression of Toll-like receptor 5 signaling. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* 293, L686–692.

Katz, J.P., Perreault, N., Goldstein, B.G., Lee, C.S., Labosky, P.A., Yang, V.W., and Kaestner, K.H. (2002). The zinc-finger transcription factor Klf4 is required for terminal differentiation of goblet cells in the colon. *Dev. Camb. Engl.* 129, 2619–2628.

Kawai, T., and Akira, S. (2010). The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors. *Nat. Immunol.* 11, 373–384.

Kazanjan, A., and Shroyer, N.F. (2011). NOTCH Signaling and ATOH1 in Colorectal Cancers. *Curr. Color. Cancer Reports* 7, 121–127.

Kazumori, H., Ishihara, S., Takahashi, Y., Amano, Y., and Kinoshita, Y. (2011). Roles of Kruppel-like factor 4 in oesophageal epithelial cells in Barrett's epithelium development. *Gut* 60, 608–617.

Khodarev, N., Ahmad, R., Rajabi, H., Pitroda, S., Kufe, T., McClary, C., Joshi, M.D., MacDermid, D., Weichselbaum, R., and Kufe, D. (2010). Cooperativity of the MUC1 oncoprotein and STAT1 pathway in poor prognosis human breast cancer. *Oncogene* 29, 920–929.

Kim, T.-H., and Shivdasani, R.A. (2011). Genetic evidence that intestinal Notch functions vary regionally and operate through a common mechanism of Math1 repression. *J. Biol. Chem.* 286, 11427–11433.

Kim, Y.S., and Ho, S.B. (2010). Intestinal goblet cells and mucins in health and disease: recent insights and progress. *Curr. Gastroenterol. Rep.* 12, 319–330.

King, A.E., Wheelhouse, N., Cameron, S., McDonald, S.E., Lee, K.-F., Entrican, G., Critchley, H.O.D., and Horne, A.W. (2009). Expression of secretory leukocyte protease inhibitor and elafin in human fallopian tube and in an in-vitro model of *Chlamydia trachomatis* infection. *Hum. Reprod. Oxf. Engl.* 24, 679–686.

Van Klinken, B.J., Oussoren, E., Weenink, J.J., Strous, G.J., Büller, H.A., Dekker, J., and Einerhand, A.W. (1996). The human intestinal cell lines Caco-2 and LS174T as models to study cell-type specific mucin expression. *Glycoconj. J.* 13, 757–768.

Van Klinken, B.J., Van der Wal, J.W., Einerhand, A.W., Büller, H.A., and Dekker, J. (1999). Sulphation and secretion of the predominant secretory human colonic mucin MUC2 in ulcerative colitis. *Gut* 44, 387–393.

Kocsis, A.K., Lakatos, P.L., Somogyvári, F., Fuszek, P., Papp, J., Fischer, S., Szamosi, T., Lakatos, L., Kovacs, A., Hofner, P., et al. (2008). Association of beta-defensin 1 single nucleotide polymorphisms with Crohn's disease. *Scand. J. Gastroenterol.* 43, 299–307.

Koslowski, M.J., Kübler, I., Chamailard, M., Schaeffeler, E., Reinisch, W., Wang, G., Beisner, J., Teml, A., Peyrin-Biroulet, L., Winter, S., et al. (2009). Genetic variants of Wnt transcription

factor TCF-4 (TCF7L2) putative promoter region are associated with small intestinal Crohn's disease. *PLoS One* 4, e4496.

Koslowski, M.J., Teltschik, Z., Beisner, J., Schaeffeler, E., Wang, G., Kübler, I., Gersemann, M., Cooney, R., Jewell, D., Reinisch, W., et al. (2012). Association of a functional variant in the Wnt co-receptor LRP6 with early onset ileal Crohn's disease. *PLoS Genet.* 8, e1002523.

Kruis, W., Fric, P., Pokrotnieks, J., Lukás, M., Fixa, B., Kascák, M., Kamm, M.A., Weismueller, J., Beglinger, C., Stolte, M., et al. (2004). Maintaining remission of ulcerative colitis with the probiotic *Escherichia coli* Nissle 1917 is as effective as with standard mesalazine. *Gut* 53, 1617–1623.

Kruis, W., Chrubasik, S., Boehm, S., Stange, C., and Schulze, J. (2012). A double-blind placebo-controlled trial to study therapeutic effects of probiotic *Escherichia coli* Nissle 1917 in subgroups of patients with irritable bowel syndrome. *Int. J. Colorectal Dis.* 27, 467–474.

Kumar, A., Takada, Y., Boriek, A.M., and Aggarwal, B.B. (2004). Nuclear factor- κ B: its role in health and disease. *J. Mol. Med.* 82, 434–448.

Kyo, Y., Kato, K., Park, Y.S., Gajghate, S., Gajhate, S., Umehara, T., Lillehoj, E.P., Suzuki, H., and Kim, K.C. (2012). Antiinflammatory role of MUC1 mucin during infection with nontypeable *Haemophilus influenzae*. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 46, 149–156.

Lagier, J.-C., Million, M., Hugon, P., Armougom, F., and Raoult, D. (2012). Human Gut Microbiota: Repertoire and Variations. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 2.

Lai, E.C. (2004). Notch signaling: control of cell communication and cell fate. *Dev. Camb. Engl.* 131, 965–973.

Lakatos, P.-L. (2006). Recent trends in the epidemiology of inflammatory bowel diseases: up or down? *World J. Gastroenterol. WJG* 12, 6102–6108.

Lawrence, T. (2009). The nuclear factor NF- κ B pathway in inflammation. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 1, a001651.

Lecat, A., Piette, J., and Legrand-Poels, S. (2010). The protein Nod2: an innate receptor more complex than previously assumed. *Biochem. Pharmacol.* 80, 2021–2031.

Lee, D.K., Jang, S., Kim, M.J., Kim, J.H., Chung, M.J., Kim, K.J., and Ha, N.J. (2008). Anti-proliferative effects of *Bifidobacterium adolescentis* SPM0212 extract on human colon cancer cell lines. *BMC Cancer* 8, 310.

Leedham, S.J., Brittan, M., McDonald, S.A.C., and Wright, N.A. (2005). Intestinal stem cells. *J. Cell. Mol. Med.* 9, 11–24.

Leow, C.C., Romero, M.S., Ross, S., Polakis, P., and Gao, W.-Q. (2004). Hath1, down-regulated in colon adenocarcinomas, inhibits proliferation and tumorigenesis of colon cancer cells. *Cancer Res.* 64, 6050–6057.

Ley, R.E., Peterson, D.A., and Gordon, J.I. (2006). Ecological and evolutionary forces shaping microbial diversity in the human intestine. *Cell* 124, 837–848.

Li, Q., Zhou, X., Nie, X., and Yang, J. (2010). The role of recombinant human elafin in the resistance of A549 cells against *Pseudomonas aeruginosa* biofilm. *Respir. Int. Rev. Thorac. Dis.* 79, 68–75.

Liévin-Le Moal, V., and Servin, A.L. (2006). The front line of enteric host defense against unwelcome intrusion of harmful microorganisms: mucins, antimicrobial peptides, and microbiota. *Clin. Microbiol. Rev.* 19, 315–337.

Lillehoj, E.P., Kim, H., Chun, E.Y., and Kim, K.C. (2004). *Pseudomonas aeruginosa* stimulates phosphorylation of the airway epithelial membrane glycoprotein Muc1 and activates MAP kinase. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* 287, L809–815.

Linden, S.K., Sutton, P., Karlsson, N.G., Korolik, V., and McGuckin, M.A. (2008). Mucins in the mucosal barrier to infection. *Mucosal Immunol.* 1, 183–197.

Lindén, S.K., Sheng, Y.H., Every, A.L., Miles, K.M., Skoog, E.C., Florin, T.H.J., Sutton, P., and McGuckin, M.A. (2009). MUC1 limits *Helicobacter pylori* infection both by steric hindrance and by acting as a releasable decoy. *PLoS Pathog.* 5, e1000617.

Longman, R.J., Poulsom, R., Corfield, A.P., Warren, B.F., Wright, N.A., and Thomas, M.G. (2006). Alterations in the composition of the supramucosal defense barrier in relation to disease severity of ulcerative colitis. *J. Histochem. Cytochem. Off. J. Histochem. Soc.* 54, 1335–1348.

Louis, P., and Flint, H.J. (2009). Diversity, metabolism and microbial ecology of butyrate-producing bacteria from the human large intestine. *FEMS Microbiol. Lett.* 294, 1–8.

Lucke, K., Miehke, S., Jacobs, E., and Schuppler, M. (2006). Prevalence of *Bacteroides* and *Prevotella* spp. in ulcerative colitis. *J. Med. Microbiol.* 55, 617–624.

Lüllmann-Rauch, R. (2009). *Histologie* (Georg Thieme Verlag).

Lyons, S., Wang, L., Casanova, J.E., Sitaraman, S.V., Merlin, D., and Gewirtz, A.T. (2004). *Salmonella typhimurium* transcytoses flagellin via an SPI2-mediated vesicular transport pathway. *J. Cell Sci.* 117, 5771–5780.

Lyss, G., Knorre, A., Schmidt, T.J., Pahl, H.L., and Merfort, I. (1998). The anti-inflammatory sesquiterpene lactone helenalin inhibits the transcription factor NF-kappaB by directly targeting p65. *J. Biol. Chem.* 273, 33508–33516.

Machiels, K., Joossens, M., Sabino, J., De Preter, V., Arijis, I., Eeckhaut, V., Ballet, V., Claes, K., Van Immerseel, F., Verbeke, K., et al. (2013). A decrease of the butyrate-producing species *Roseburia hominis* and *Faecalibacterium prausnitzii* defines dysbiosis in patients with ulcerative colitis. *Gut*.

Mack, D.R. (2011). Probiotics in inflammatory bowel diseases and associated conditions. *Nutrients* 3, 245–264.

Mack, D.R., Ahrne, S., Hyde, L., Wei, S., and Hollingsworth, M.A. (2003). Extracellular MUC3 mucin secretion follows adherence of *Lactobacillus* strains to intestinal epithelial cells in vitro. *Gut* 52, 827–833.

Macpherson, A.J., and Harris, N.L. (2004). Interactions between commensal intestinal bacteria and the immune system. *Nat. Rev. Immunol.* 4, 478–485.

Madsen, K., Cornish, A., Soper, P., McKaigney, C., Jijon, H., Yachimec, C., Doyle, J., Jewell, L., and De Simone, C. (2001). Probiotic bacteria enhance murine and human intestinal epithelial barrier function. *Gastroenterology* 121, 580–591.

Maeda, S., and Omata, M. (2008). Inflammation and cancer: role of nuclear factor-kappaB activation. *Cancer Sci.* 99, 836–842.

Maier, H.J., Wagner, M., Schips, T.G., Salem, H.H., Baumann, B., and Wirth, T. (2013). Requirement of NEMO/IKK γ for effective expansion of KRAS-induced precancerous lesions in the pancreas. *Oncogene* 32, 2690–2695.

Marischen, L., Wesch, D., Schröder, J.-M., Wiedow, O., and Kabelitz, D. (2009). Human gammadelta T cells produce the protease inhibitor and antimicrobial peptide elafin. *Scand. J. Immunol.* 70, 547–552.

Marteau, P., and Chaput, U. (2011). Bacteria as trigger for chronic gastrointestinal disorders. *Dig. Dis. Basel Switz.* 29, 166–171.

Matsuo, K., Ota, H., Akamatsu, T., Sugiyama, A., and Katsuyama, T. (1997). Histochemistry of the surface mucous gel layer of the human colon. *Gut* 40, 782–789.

Matthes, H., Krummenerl, T., Giensch, M., Wolff, C., and Schulze, J. (2010). Clinical trial: probiotic treatment of acute distal ulcerative colitis with rectally administered *Escherichia coli* Nissle 1917 (EcN). *BMC Complement. Altern. Med.* 10, 13.

McAuley, J.L., Linden, S.K., Png, C.W., King, R.M., Pennington, H.L., Gendler, S.J., Florin, T.H., Hill, G.R., Korolik, V., and McGuckin, M.A. (2007). MUC1 cell surface mucin is a critical element of the mucosal barrier to infection. *J. Clin. Invest.* 117, 2313–2324.

McCormick, D.A., Horton, L.W., and Mee, A.S. (1990). Mucin depletion in inflammatory bowel disease. *J. Clin. Pathol.* 43, 143–146.

McSorley, S.J., Cookson, B.T., and Jenkins, M.K. (2000). Characterization of CD4 $^{+}$ T cell responses during natural infection with *Salmonella typhimurium*. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 164, 986–993.

Van de Merwe, J.P., Stegeman, J.H., and Hazenberg, M.P. (1983). The resident faecal flora is determined by genetic characteristics of the host. Implications for Crohn's disease? *Antonie Van Leeuwenhoek* 49, 119–124.

Meslin, J.C., Fontaine, N., and Andrieux, C. (1999). Variation of mucin distribution in the rat intestine, caecum and colon: effect of the bacterial flora. *Comp. Biochem. Physiol. A. Mol. Integr. Physiol.* 123, 235–239.

Meyer-Hoffert, U., Wichmann, N., Schwichtenberg, L., White, P.C., and Wiedow, O. (2003). Supernatants of *Pseudomonas aeruginosa* induce the *Pseudomonas*-specific antibiotic elafin in human keratinocytes. *Exp. Dermatol.* 12, 418–425.

Miao, E.A., Alpuche-Aranda, C.M., Dors, M., Clark, A.E., Bader, M.W., Miller, S.I., and Aderem, A. (2006). Cytoplasmic flagellin activates caspase-1 and secretion of interleukin 1 β via Ipaf. *Nat. Immunol.* 7, 569–575.

Milano, J., McKay, J., Dagenais, C., Foster-Brown, L., Pognan, F., Gadiant, R., Jacobs, R.T., Zacco, A., Greenberg, B., and Ciaccio, P.J. (2004). Modulation of notch processing by gamma-secretase inhibitors causes intestinal goblet cell metaplasia and induction of genes known to specify gut secretory lineage differentiation. *Toxicol. Sci. Off. J. Soc. Toxicol.* 82, 341–358.

Moehle, C., Ackermann, N., Langmann, T., Aslanidis, C., Kel, A., Kel-Margoulis, O., Schmitz-Madry, A., Zahn, A., Stremmel, W., and Schmitz, G. (2006). Aberrant intestinal expression and allelic variants of mucin genes associated with inflammatory bowel disease. *J. Mol. Med.* 84, 1055–1066.

Möndel, M., Schroeder, B.O., Zimmermann, K., Huber, H., Nuding, S., Beisner, J., Fellermann, K., Stange, E.F., and Wehkamp, J. (2009). Probiotic *E. coli* treatment mediates antimicrobial human beta-defensin synthesis and fecal excretion in humans. *Mucosal Immunol.* 2, 166–172.

Monteleone, G., Pallone, F., and Stolfi, C. (2012). The Dual Role of Inflammation in Colon Carcinogenesis. *Int. J. Mol. Sci.* 13, 11071–11084.

Moran, S.T., Cariappa, A., Liu, H., Muir, B., Sgroi, D., Boboila, C., and Pillai, S. (2007). Synergism between NF- κ B1/p50 and Notch2 during the development of marginal zone B lymphocytes. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 179, 195–200.

Moreira, L.O., and Zamboni, D.S. (2012). NOD1 and NOD2 Signaling in Infection and Inflammation. *Front. Immunol.* 3, 328.

Motta, J.-P., Magne, L., Descamps, D., Rolland, C., Squarzone-Dale, C., Rousset, P., Martin, L., Cenac, N., Balloy, V., Huerre, M., et al. (2011). Modifying the protease, antiprotease pattern by elafin overexpression protects mice from colitis. *Gastroenterology* 140, 1272–1282.

Mutch, D.M., Simmering, R., Donnicola, D., Fotopoulos, G., Holzwarth, J.A., Williamson, G., and Corthésy-Theulaz, I. (2004). Impact of commensal microbiota on murine gastrointestinal tract gene ontologies. *Physiol. Genomics* 19, 22–31.

Narayana, Y., and Balaji, K.N. (2008). NOTCH1 up-regulation and signaling involved in *Mycobacterium bovis* BCG-induced SOCS3 expression in macrophages. *J. Biol. Chem.* 283, 12501–12511.

Nenci, A., Becker, C., Wullaert, A., Gareus, R., van Loo, G., Danese, S., Huth, M., Nikolaev, A., Neufert, C., Madison, B., et al. (2007). Epithelial NEMO links innate immunity to chronic intestinal inflammation. *Nature* 446, 557–561.

Ng, A.Y.-N., Waring, P., Ristevski, S., Wang, C., Wilson, T., Pritchard, M., Hertzog, P., and Kola, I. (2002). Inactivation of the transcription factor Elf3 in mice results in dysmorphogenesis and altered differentiation of intestinal epithelium. *Gastroenterology* 122, 1455–1466.

Nishio, J., and Honda, K. (2012). Immunoregulation by the gut microbiota. *Cell. Mol. Life Sci. CMLS* 69, 3635–3650.

O’Neil, D.A., Porter, E.M., Elewaut, D., Anderson, G.M., Eckmann, L., Ganz, T., and Kagnoff, M.F. (1999). Expression and regulation of the human beta-defensins hBD-1 and hBD-2 in intestinal epithelium. *J. Immunol. Baltim. Md* 1950 163, 6718–6724.

Ochoa-Hernández, A.B., Juárez-Vázquez, C.I., Rosales-Reynoso, M.A., and Barros-Núñez, P. (2012). [WNT- β -catenin signaling pathway and its relationship with cancer]. *Cir. Cir.* 80, 389–398.

Oelschlaeger, T.A. (2010a). Mechanisms of probiotic actions - A review. *Int. J. Med. Microbiol. IJMM* 300, 57–62.

Oelschlaeger, T.A. (2010b). Bacteria as tumor therapeutics? *Bioeng. Bugs* 1, 146–147.

Ogushi, K., Wada, A., Niidome, T., Mori, N., Oishi, K., Nagatake, T., Takahashi, A., Asakura, H., Makino, S., Hojo, H., et al. (2001). Salmonella enteritidis *FliC* (Flagella Filament Protein) Induces Human β -Defensin-2 mRNA Production by Caco-2 Cells. *J. Biol. Chem.* 276, 30521–30526.

Okamoto, R., Tsuchiya, K., Nemoto, Y., Akiyama, J., Nakamura, T., Kanai, T., and Watanabe, M. (2009). Requirement of Notch activation during regeneration of the intestinal epithelia. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 296, G23–35.

Ommori, R., Oujii, N., Mizuno, F., Kita, E., Ikada, Y., and Asada, H. (2013). Selective induction of antimicrobial peptides from keratinocytes by staphylococcal bacteria. *Microb. Pathog.* 56, 35–39.

Oppenheim, J.J., Biragyn, A., Kwak, L.W., and Yang, D. (2003). Roles of antimicrobial peptides such as defensins in innate and adaptive immunity. *Ann. Rheum. Dis.* 62 Suppl 2, ii17–21.

Otte, J.-M., and Podolsky, D.K. (2004). Functional modulation of enterocytes by gram-positive and gram-negative microorganisms. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 286, G613–626.

Ouellette, A.J. (2004). Defensin-mediated innate immunity in the small intestine. *Best Pract. Res. Clin. Gastroenterol.* 18, 405–419.

Paasché, S. (2013). Fecal microbiota transplantation: an innovative approach to treating *Clostridium difficile* disease. *JAAPA Off. J. Am. Acad. Physician Assist.* 26, 46–49.

Packey, C.D., and Sartor, R.B. (2008). Interplay of commensal and pathogenic bacteria, genetic mutations, and immunoregulatory defects in the pathogenesis of inflammatory bowel diseases. *J. Intern. Med.* 263, 597–606.

Papo, N., and Shai, Y. (2005). Host defense peptides as new weapons in cancer treatment. *Cell. Mol. Life Sci. CMLS* 62, 784–790.

Park, E.T., Oh, H.K., Gum, J.R., Jr, Crawley, S.C., Kakar, S., Engel, J., Leow, C.C., Gao, W.-Q., and Kim, Y.S. (2006). HATH1 expression in mucinous cancers of the colorectum and related lesions. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* 12, 5403–5410.

Park, J.-H., Kim, H., Choy, H.E., and Kim, K. (2005). Presence of presenilin 1/2 affects the invasion and replication of *Salmonella typhimurium*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 332, 1081–1085.

Parker, N., Tsai, H.H., Ryder, S.D., Raouf, A.H., and Rhodes, J.M. (1995). Increased rate of sialylation of colonic mucin by cultured ulcerative colitis mucosal explants. *Digestion* 56, 52–56.

Peignon, G., Durand, A., Cacheux, W., Ayrault, O., Terris, B., Laurent-Puig, P., Shroyer, N.F., Van Seuning, I., Honjo, T., Perret, C., et al. (2011). Complex interplay between β -catenin signalling and Notch effectors in intestinal tumorigenesis. *Gut* 60, 166–176.

Peyrin-Biroulet, L., Beisner, J., Wang, G., Nuding, S., Oommen, S.T., Kelly, D., Parmentier-Decrucq, E., Dessein, R., Merour, E., Chavatte, P., et al. (2010). Peroxisome proliferator-activated receptor gamma activation is required for maintenance of innate antimicrobial immunity in the colon. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 107, 8772–8777.

Png, C.W., Lindén, S.K., Gilshenan, K.S., Zoetendal, E.G., McSweeney, C.S., Sly, L.I., McGuckin, M.A., and Florin, T.H.J. (2010). Mucolytic bacteria with increased prevalence in IBD mucosa augment in vitro utilization of mucin by other bacteria. *Am. J. Gastroenterol.* 105, 2420–2428.

Podolsky, D.K. (2002). Inflammatory bowel disease. *N. Engl. J. Med.* 347, 417–429.

Pullan, R.D., Thomas, G.A., Rhodes, M., Newcombe, R.G., Williams, G.T., Allen, A., and Rhodes, J. (1994). Thickness of adherent mucus gel on colonic mucosa in humans and its relevance to colitis. *Gut* 35, 353–359.

Rafter, J., Bennett, M., Caderni, G., Clune, Y., Hughes, R., Karlsson, P.C., Klinder, A., O’Riordan, M., O’Sullivan, G.C., Pool-Zobel, B., et al. (2007). Dietary synbiotics reduce cancer risk factors in polypectomized and colon cancer patients. *Am. J. Clin. Nutr.* 85, 488–496.

Ramos, H.C., Rumbo, M., and Sirard, J.-C. (2004). Bacterial flagellins: mediators of pathogenicity and host immune responses in mucosa. *Trends Microbiol.* 12, 509–517.

Randall, D.J., Burggren, W., and French, K. (2002). *Tierphysiologie: 55 Tabellen ; [jetzt mit Glossar]* (Georg Thieme Verlag).

Rath, H.C., Ikeda, J.S., Linde, H.J., Schölmerich, J., Wilson, K.H., and Sartor, R.B. (1999). Varying cecal bacterial loads influences colitis and gastritis in HLA-B27 transgenic rats. *Gastroenterology* 116, 310–319.

Reddy, B.S., and Rivenson, A. (1993). Inhibitory effect of *Bifidobacterium longum* on colon, mammary, and liver carcinogenesis induced by 2-amino-3-methylimidazo[4,5-f]quinoline, a food mutagen. *Cancer Res.* 53, 3914–3918.

- Reddy, B.S., Narisawa, T., Wright, P., Vukusich, D., Weisburger, J.H., and Wynder, E.L. (1975). Colon carcinogenesis with azoxymethane and dimethylhydrazine in germ-free rats. *Cancer Res.* **35**, 287–290.
- Reedijk, M., Odorcic, S., Zhang, H., Chetty, R., Tennert, C., Dickson, B.C., Lockwood, G., Gallinger, S., and Egan, S.E. (2008). Activation of Notch signaling in human colon adenocarcinoma. *Int. J. Oncol.* **33**, 1223–1229.
- Reuter, S., Gupta, S.C., Chaturvedi, M.M., and Aggarwal, B.B. (2010). Oxidative stress, inflammation, and cancer: How are they linked? *Free Radic. Biol. Med.* **49**, 1603–1616.
- Rhee, S.H., Kim, H., Moyer, M.P., and Pothoulakis, C. (2006). Role of MyD88 in phosphatidylinositol 3-kinase activation by flagellin/toll-like receptor 5 engagement in colonic epithelial cells. *J. Biol. Chem.* **281**, 18560–18568.
- Rizzo, A., Pallone, F., Monteleone, G., and Fantini, M.C. (2011). Intestinal inflammation and colorectal cancer: a double-edged sword? *World J. Gastroenterol. WJG* **17**, 3092–3100.
- Roy, C.R., and Zamboni, D.S. (2006). Cytosolic detection of flagellin: a deadly twist. *Nat. Immunol.* **7**, 549–551.
- Sacksteder, M.R. (1976). Occurrence of spontaneous tumors in the germfree F344 rat. *J. Natl. Cancer Inst.* **57**, 1371–1373.
- Sánchez-Muñoz, F., Fonseca-Camarillo, G., Villeda-Ramírez, M.A., Miranda-Pérez, E., Mendivil, E.J., Barreto-Zúñiga, R., Uribe, M., Bojalil, R., Domínguez-López, A., and Yamamoto-Furusho, J.K. (2011). Transcript levels of Toll-Like Receptors 5, 8 and 9 correlate with inflammatory activity in Ulcerative Colitis. *BMC Gastroenterol.* **11**, 138.
- Sancho, E., Batlle, E., and Clevers, H. (2003). Live and let die in the intestinal epithelium. *Curr. Opin. Cell Biol.* **15**, 763–770.
- Sanderson, J.D., Moss, M.T., Tizard, M.L., and Hermon-Taylor, J. (1992). *Mycobacterium paratuberculosis* DNA in Crohn's disease tissue. *Gut* **33**, 890–896.
- Savage, D.C. (1977). Microbial ecology of the gastrointestinal tract. *Annu. Rev. Microbiol.* **31**, 107–133.
- Schauber, J., Rieger, D., Weiler, F., Wehkamp, J., Eck, M., Fellermann, K., Scheppach, W., Gallo, R.L., and Stange, E.F. (2006). Heterogeneous expression of human cathelicidin hCAP18/LL-37 in inflammatory bowel diseases. *Eur. J. Gastroenterol. Hepatol.* **18**, 615–621.
- Schlee, M., Wehkamp, J., Altenhoefer, A., Oelschlaeger, T.A., Stange, E.F., and Fellermann, K. (2007). Induction of human beta-defensin 2 by the probiotic *Escherichia coli* Nissle 1917 is mediated through flagellin. *Infect. Immun.* **75**, 2399–2407.
- Schmid, M., Fellermann, K., Fritz, P., Wiedow, O., Stange, E.F., and Wehkamp, J. (2007). Attenuated induction of epithelial and leukocyte serine antiproteases elafin and secretory leukocyte protease inhibitor in Crohn's disease. *J. Leukoc. Biol.* **81**, 907–915.

Scholtens, P.A.M.J., Oozeer, R., Martin, R., Amor, K.B., and Knol, J. (2012). The early settlers: intestinal microbiology in early life. *Annu. Rev. Food Sci. Technol.* 3, 425–447.

Schreiber, S., Raedler, A., Stenson, W.F., and MacDermott, R.P. (1992). The role of the mucosal immune system in inflammatory bowel disease. *Gastroenterol. Clin. North Am.* 21, 451–502.

Schroeder, B.O., Wu, Z., Nuding, S., Groscurth, S., Marcinowski, M., Beisner, J., Buchner, J., Schaller, M., Stange, E.F., and Wehkamp, J. (2011). Reduction of disulphide bonds unmasks potent antimicrobial activity of human β -defensin 1. *Nature* 469, 419–423.

Schwerbrock, N.M.J., Makkink, M.K., van der Sluis, M., Büller, H.A., Einerhand, A.W.C., Sartor, R.B., and Dekker, J. (2004). Interleukin 10-deficient mice exhibit defective colonic Muc2 synthesis before and after induction of colitis by commensal bacteria. *Inflamm. Bowel Dis.* 10, 811–823.

Sellon, R.K., Tonkonogy, S., Schultz, M., Dieleman, L.A., Grenther, W., Balish, E., Rennick, D.M., and Sartor, R.B. (1998). Resident enteric bacteria are necessary for development of spontaneous colitis and immune system activation in interleukin-10-deficient mice. *Infect. Immun.* 66, 5224–5231.

Shao, Z.-J., Zheng, X.-W., Feng, T., Huang, J., Chen, J., Wu, Y.-Y., Zhou, L.-M., Tu, W.-W., and Li, H. (2012). Andrographolide exerted its antimicrobial effects by upregulation of human β -defensin-2 induced through p38 MAPK and NF- κ B pathway in human lung epithelial cells. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 90, 647–653.

Shen, X.J., Rawls, J.F., Randall, T., Burcal, L., Mpande, C.N., Jenkins, N., Jovov, B., Abdo, Z., Sandler, R.S., and Keku, T.O. (2010). Molecular characterization of mucosal adherent bacteria and associations with colorectal adenomas. *Gut Microbes* 1, 138–147.

Shirazi, T., Longman, R.J., Corfield, A.P., and Probert, C.S. (2000). Mucins and inflammatory bowel disease. *Postgrad. Med. J.* 76, 473–478.

Shirkey, T.W., Siggers, R.H., Goldade, B.G., Marshall, J.K., Drew, M.D., Laarveld, B., and Van Kessel, A.G. (2006). Effects of commensal bacteria on intestinal morphology and expression of proinflammatory cytokines in the gnotobiotic pig. *Exp. Biol. Med.* Maywood NJ 231, 1333–1345.

Shroyer, N.F., Helmrath, M.A., Wang, V.Y.-C., Antalffy, B., Henning, S.J., and Zoghbi, H.Y. (2007). Intestine-specific ablation of mouse atonal homolog 1 (Math1) reveals a role in cellular homeostasis. *Gastroenterology* 132, 2478–2488.

Simpson, A.J., Maxwell, A.I., Govan, J.R., Haslett, C., and Sallenave, J.M. (1999). Elafin (elastase-specific inhibitor) has anti-microbial activity against gram-positive and gram-negative respiratory pathogens. *FEBS Lett.* 452, 309–313.

Van der Sluis, M., De Koning, B.A.E., De Bruijn, A.C.J.M., Velcich, A., Meijerink, J.P.P., Van Goudoever, J.B., Büller, H.A., Dekker, J., Van Seuningen, I., Renes, I.B., et al. (2006). Muc2-deficient mice spontaneously develop colitis, indicating that MUC2 is critical for colonic protection. *Gastroenterology* 131, 117–129.

Smith, P.K., Krohn, R.I., Hermanson, G.T., Mallia, A.K., Gartner, F.H., Provenzano, M.D., Fujimoto, E.K., Goeke, N.M., Olson, B.J., and Klenk, D.C. (1985). Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal. Biochem.* *150*, 76–85.

Snook, J.A., Silva, H.J. de, and Jewell, D.P. (1989). The Association of Autoimmune Disorders with Inflammatory Bowel Disease. *QJM* *72*, 835–840.

Sobhani, I., Amiot, A., Le Baleur, Y., Levy, M., Auriault, M.-L., Van Nhieu, J.T., and Delchier, J.C. (2013). Microbial dysbiosis and colon carcinogenesis: could colon cancer be considered a bacteria-related disease? *Ther. Adv. Gastroenterol.* *6*, 215–229.

Sokol, H., Pigneur, B., Watterlot, L., Lakhdari, O., Bermúdez-Humarán, L.G., Gratadoux, J.-J., Blugeon, S., Bridonneau, C., Furet, J.-P., Corthier, G., et al. (2008). *Faecalibacterium prausnitzii* is an anti-inflammatory commensal bacterium identified by gut microbiota analysis of Crohn disease patients. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *105*, 16731–16736.

Stange, E.F. (2009). *Colitis ulcerosa - Morbus Crohn* (Bremen; London; Boston, Mass.: UNI-MED-Verl.).

Stecher, B., and Hardt, W.-D. (2008). The role of microbiota in infectious disease. *Trends Microbiol.* *16*, 107–114.

Ström, A., Castella, P., Rockwood, J., Wagner, J., and Caudy, M. (1997). Mediation of NGF signaling by post-translational inhibition of HES-1, a basic helix-loop-helix repressor of neuronal differentiation. *Genes Dev.* *11*, 3168–3181.

Strugala, V., Dettmar, P.W., and Pearson, J.P. (2008). Thickness and continuity of the adherent colonic mucus barrier in active and quiescent ulcerative colitis and Crohn's disease. *Int. J. Clin. Pract.* *62*, 762–769.

Sun, J. (2010). Enteric Bacteria and Cancer Stem Cells. *Cancers (Basel)* *3*, 285–297.

Sun, J., Hobert, M.E., Rao, A.S., Neish, A.S., and Madara, J.L. (2004). Bacterial activation of beta-catenin signaling in human epithelia. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* *287*, G220–227.

Suzuki, K., Fukui, H., Kayahara, T., Sawada, M., Seno, H., Hiai, H., Kageyama, R., Okano, H., and Chiba, T. (2005). Hes1-deficient mice show precocious differentiation of Paneth cells in the small intestine. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *328*, 348–352.

Swidsinski, A., Khilkin, M., Kerjaschki, D., Schreiber, S., Ortner, M., Weber, J., and Lochs, H. (1998). Association between intraepithelial *Escherichia coli* and colorectal cancer. *Gastroenterology* *115*, 281–286.

Swidsinski, A., Ladhoff, A., Pernthaler, A., Swidsinski, S., Loening-Baucke, V., Ortner, M., Weber, J., Hoffmann, U., Schreiber, S., Dietel, M., et al. (2002). Mucosal flora in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* *122*, 44–54.

Swidsinski, A., Loening-Baucke, V., Theissig, F., Engelhardt, H., Bengmark, S., Koch, S., Lochs, H., and Dörffel, Y. (2007). Comparative study of the intestinal mucus barrier in normal and inflamed colon. *Gut* *56*, 343–350.

Szentkúti, L., Riedesel, H., Enss, M.L., Gaertner, K., and Von Engelhardt, W. (1990). Pre-epithelial mucus layer in the colon of conventional and germ-free rats. *Histochem. J.* 22, 491–497.

Tak, P.P., and Firestein, G.S. (2001). NF-kappaB: a key role in inflammatory diseases. *J. Clin. Invest.* 107, 7–11.

Tallant, T., Deb, A., Kar, N., Lupica, J., Veer, M.J. de, and DiDonato, J.A. (2004). Flagellin acting via TLR5 is the major activator of key signaling pathways leading to NF-κB and proinflammatory gene program activation in intestinal epithelial cells. *BMC Microbiol.* 4, 33.

Tamboli, C.P., Neut, C., Desreumaux, P., and Colombel, J.F. (2004). Dysbiosis in inflammatory bowel disease. *Gut* 53, 1–4.

Terzić, J., Grivennikov, S., Karin, E., and Karin, M. (2010). Inflammation and colon cancer. *Gastroenterology* 138, 2101–2114.e5.

Thompson, G.R., and Trexler, P.C. (1971). Gastrointestinal structure and function in germ-free or gnotobiotic animals. *Gut* 12, 230–235.

Trebichavsky, I., Splichal, I., Rada, V., and Splichalova, A. (2010). Modulation of natural immunity in the gut by *Escherichia coli* strain Nissle 1917. *Nutr. Rev.* 68, 459–464.

Troge, A., Scheppach, W., Schroeder, B.O., Rund, S.A., Heuner, K., Wehkamp, J., Stange, E.F., and Oelschlaeger, T.A. (2012). More than a marine propeller--the flagellum of the probiotic *Escherichia coli* strain Nissle 1917 is the major adhesin mediating binding to human mucus. *Int. J. Med. Microbiol. IJMM* 302, 304–314.

Tytgat, K.M., Büller, H.A., Opdam, F.J., Kim, Y.S., Einerhand, A.W., and Dekker, J. (1994). Biosynthesis of human colonic mucin: Muc2 is the prominent secretory mucin. *Gastroenterology* 107, 1352–1363.

Tytgat, K.M., van der Wal, J.W., Einerhand, A.W., Büller, H.A., and Dekker, J. (1996). Quantitative analysis of MUC2 synthesis in ulcerative colitis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 224, 397–405.

Udhayakumar, G., Jayanthi, V., Devaraj, N., and Devaraj, H. (2007). Interaction of MUC1 with beta-catenin modulates the Wnt target gene cyclinD1 in *H. pylori*-induced gastric cancer. *Mol. Carcinog.* 46, 807–817.

Ueno, K., Koga, T., Kato, K., Golenbock, D.T., Gendler, S.J., Kai, H., and Kim, K.C. (2008). MUC1 mucin is a negative regulator of toll-like receptor signaling. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 38, 263–268.

Ukena, S.N., Westendorf, A.M., Hansen, W., Rohde, M., Geffers, R., Coldewey, S., Suerbaum, S., Buer, J., and Gunzer, F. (2005). The host response to the probiotic *Escherichia coli* strain Nissle 1917: Specific up-regulation of the proinflammatory chemokine MCP-1. *BMC Med. Genet.* 6, 43.

Uronis, J.M., Mühlbauer, M., Herfarth, H.H., Rubinas, T.C., Jones, G.S., and Jobin, C. (2009). Modulation of the intestinal microbiota alters colitis-associated colorectal cancer susceptibility. *PLoS One* 4, e6026.

Vannucci, L., Stepankova, R., Kozakova, H., Fiserova, A., Rossmann, P., and Tlaskalova-Hogenova, H. (2008). Colorectal carcinogenesis in germ-free and conventionally reared rats: different intestinal environments affect the systemic immunity. *Int. J. Oncol.* 32, 609–617.

Vijay-Kumar, M., Sanders, C.J., Taylor, R.T., Kumar, A., Aitken, J.D., Sitaraman, S.V., Neish, A.S., Uematsu, S., Akira, S., Williams, I.R., et al. (2007). Deletion of TLR5 results in spontaneous colitis in mice. *J. Clin. Invest.* 117, 3909–3921.

Wada, A., Ogushi, K., Kimura, T., Hojo, H., Mori, N., Suzuki, S., Kumatori, A., Se, M., Nakahara, Y., Nakamura, M., et al. (2001). *Helicobacter pylori*-mediated transcriptional regulation of the human beta-defensin 2 gene requires NF-kappaB. *Cell. Microbiol.* 3, 115–123.

Waidmann, M., Bechtold, O., Frick, J.-S., Lehr, H.-A., Schubert, S., Dobrindt, U., Loeffler, J., Bohn, E., and Autenrieth, I.B. (2003). *Bacteroides vulgatus* protects against *Escherichia coli*-induced colitis in gnotobiotic interleukin-2-deficient mice. *Gastroenterology* 125, 162–177.

Walker, A.W., Sanderson, J.D., Churcher, C., Parkes, G.C., Hudspith, B.N., Rayment, N., Brostoff, J., Parkhill, J., Dougan, G., and Petrovska, L. (2011). High-throughput clone library analysis of the mucosa-associated microbiota reveals dysbiosis and differences between inflamed and non-inflamed regions of the intestine in inflammatory bowel disease. *BMC Microbiol.* 11, 7.

Wang, M., Ahrné, S., Jeppsson, B., and Molin, G. (2005). Comparison of bacterial diversity along the human intestinal tract by direct cloning and sequencing of 16S rRNA genes. *FEMS Microbiol. Ecol.* 54, 219–231.

Wang, S.-L., Wang, Z.-R., and Yang, C.-Q. (2012). Meta-analysis of broad-spectrum antibiotic therapy in patients with active inflammatory bowel disease. *Exp. Ther. Med.* 4, 1051–1056.

Wehkamp, J., Fellermann, K., Herrlinger, K.R., Baxmann, S., Schmidt, K., Schwind, B., Duchrow, M., Wohlschläger, C., Feller, A.C., and Stange, E.F. (2002). Human beta-defensin 2 but not beta-defensin 1 is expressed preferentially in colonic mucosa of inflammatory bowel disease. *Eur. J. Gastroenterol. Hepatol.* 14, 745–752.

Wehkamp, J., Harder, J., Weichenthal, M., Mueller, O., Herrlinger, K.R., Fellermann, K., Schroeder, J.M., and Stange, E.F. (2003). Inducible and constitutive beta-defensins are differentially expressed in Crohn's disease and ulcerative colitis. *Inflamm. Bowel Dis.* 9, 215–223.

Wehkamp, J., Harder, J., Weichenthal, M., Schwab, M., Schäffeler, E., Schlee, M., Herrlinger, K.R., Stallmach, A., Noack, F., Fritz, P., et al. (2004a). NOD2 (CARD15) mutations in Crohn's disease are associated with diminished mucosal alpha-defensin expression. *Gut* 53, 1658–1664.

Wehkamp, J., Harder, J., Wehkamp, K., Wehkamp-von Meissner, B., Schlee, M., Enders, C., Sonnenborn, U., Nuding, S., Bengmark, S., Fellermann, K., et al. (2004b). NF-kappaB- and AP-

1-mediated induction of human beta defensin-2 in intestinal epithelial cells by *Escherichia coli* Nissle 1917: a novel effect of a probiotic bacterium. *Infect. Immun.* 72, 5750–5758.

Wehkamp, J., Salzman, N.H., Porter, E., Nuding, S., Weichenthal, M., Petras, R.E., Shen, B., Schaeffeler, E., Schwab, M., Linzmeier, R., et al. (2005). Reduced Paneth cell alpha-defensins in ileal Crohn's disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 102, 18129–18134.

Wehkamp, J., Chu, H., Shen, B., Feathers, R.W., Kays, R.J., Lee, S.K., and Bevins, C.L. (2006). Paneth cell antimicrobial peptides: topographical distribution and quantification in human gastrointestinal tissues. *FEBS Lett.* 580, 5344–5350.

Wehkamp, J., Wang, G., Kübler, I., Nuding, S., Gregorieff, A., Schnabel, A., Kays, R.J., Fellermann, K., Burk, O., Schwab, M., et al. (2007). The Paneth cell alpha-defensin deficiency of ileal Crohn's disease is linked to Wnt/Tcf-4. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 179, 3109–3118.

Wehkamp, J., Koslowski, M., Wang, G., and Stange, E.F. (2008). Barrier dysfunction due to distinct defensin deficiencies in small intestinal and colonic Crohn's disease. *Mucosal Immunol.* 1 Suppl 1, S67–74.

White, B.D., Chien, A.J., and Dawson, D.W. (2012). Dysregulation of Wnt/ β -catenin Signaling in Gastrointestinal Cancers. *Gastroenterology* 142, 219–232.

Williams, S.E., Brown, T.I., Roghanian, A., and Sallenave, J.-M. (2006). SLPI and elafin: one glove, many fingers. *Clin. Sci. Lond. Engl.* 1979 110, 21–35.

Witthöft, T., Pilz, C.S., Fellermann, K., Nitschke, M., Stange, E.F., and Ludwig, D. (2005). Enhanced human beta-defensin-2 (hBD-2) expression by corticosteroids is independent of NF-kappaB in colonic epithelial cells (CaCo2). *Dig. Dis. Sci.* 50, 1252–1259.

Xing, Q., Ye, Q., Fan, M., Zhou, Y., Xu, Q., and Sandham, A. (2010). *Porphyromonas gingivalis* lipopolysaccharide inhibits the osteoblastic differentiation of preosteoblasts by activating Notch1 signaling. *J. Cell. Physiol.* 225, 106–114.

Xu, J., and Gordon, J.I. (2003). Honor thy symbionts. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 100, 10452–10459.

Yang, Q., Bermingham, N.A., Finegold, M.J., and Zoghbi, H.Y. (2001). Requirement of Math1 for secretory cell lineage commitment in the mouse intestine. *Science* 294, 2155–2158.

Yin, L., Swanson, B., An, J., Hacker, B.M., Silverman, G.A., Dale, B.A., and Chung, W.O. (2010). Differential effects of periopathogens on host protease inhibitors SLPI, elafin, SCCA1, and SCCA2. *J. Oral Microbiol.* 2.

Yu, Y., Zeng, H., Lyons, S., Carlson, A., Merlin, D., Neish, A.S., and Gewirtz, A.T. (2003). TLR5-mediated activation of p38 MAPK regulates epithelial IL-8 expression via posttranscriptional mechanism. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 285, G282–290.

Zasloff, M. (2002). Antimicrobial peptides of multicellular organisms. *Nature* 415, 389–395.

- Zeng, H., Wu, H., Sloane, V., Jones, R., Yu, Y., Lin, P., Gewirtz, A.T., and Neish, A.S. (2006). Flagellin/TLR5 responses in epithelia reveal intertwined activation of inflammatory and apoptotic pathways. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* **290**, G96–G108.
- Zhang, X., Yang, Y., Zhu, R., Bai, J., Tian, Y., Li, X., Peng, Z., He, Y., Chen, L., Fang, D., et al. (2012). *H. pylori* induces the expression of Hath1 in gastric epithelial cells via interleukin-8/STAT3 phosphorylation while suppressing Hes1. *J. Cell. Biochem.* **113**, 3740–3751.
- Zhao, C., Wang, I., and Lehrer, R.I. (1996). Widespread expression of beta-defensin hBD-1 in human secretory glands and epithelial cells. *FEBS Lett.* **396**, 319–322.
- Zheng, H., Pritchard, D.M., Yang, X., Bennett, E., Liu, G., Liu, C., and Ai, W. (2009). KLF4 gene expression is inhibited by the notch signaling pathway that controls goblet cell differentiation in mouse gastrointestinal tract. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* **296**, G490–498.
- Zheng, J.L., Shou, J., Guillemot, F., Kageyama, R., and Gao, W.Q. (2000). Hes1 is a negative regulator of inner ear hair cell differentiation. *Dev. Camb. Engl.* **127**, 4551–4560.
- Zheng, X., Tsuchiya, K., Okamoto, R., Iwasaki, M., Kano, Y., Sakamoto, N., Nakamura, T., and Watanabe, M. (2011). Suppression of hath1 gene expression directly regulated by hes1 via notch signaling is associated with goblet cell depletion in ulcerative colitis. *Inflamm. Bowel Dis.* **17**, 2251–2260.
- Zhou, Q., and Amar, S. (2007). Identification of signaling pathways in macrophage exposed to *Porphyromonas gingivalis* or to its purified cell wall components. *J. Immunol. Baltim. Md* **1950** **179**, 7777–7790.
- Zhu, Y., Luo, T.M., Jobin, C., and Young, H.A. (2011). Gut Microbiota and Probiotics in Colon Tumorigenesis. *Cancer Lett.* **309**, 119–127.

Zusammenfassung

Der Gastrointestinaltrakt bietet einen Lebensraum für eine große Population an Mikroorganismen, wobei der Dickdarm den am dichtesten besiedelten Abschnitt darstellt. Neben vielen Vorteilen bergen kommensale Mikrobiota jedoch auch eine potentielle Gefahr für ihren Wirt. Aktuell wird ein Zusammenhang zwischen Darmmikroorganismen und intestinalen Erkrankungen wie den chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen (CED) aber auch der Entstehung von Kolonkarzinomen weitreichend diskutiert und untersucht. Im physiologischen Zustand existiert eine friedvolle mutualistische Koexistenz zwischen Wirt und Darmbakterien, gewährleistet durch eine multifaktorielle und vielschichtige mukosale Barriere. Viele wichtige Funktionen der Abwehr übernimmt dabei das einschichtige Epithel, welches die innere Darmwand auskleidet. Es produziert z.B. antimikrobielle Peptide (AMPs) wie Defensine und Elafin, die Keime daran hindern in die Mukosa einzudringen und eine Entzündungsreaktion auszulösen. Auch der Mukus, welcher von Becherzellen produziert wird und die Darmwand umhüllt, leistet nicht nur eine mechanische, sondern auch eine chemische Abwehr in dem er z.B. AMPs bindet.

Das Darmepithel unterliegt einer ständigen Regenerierung und somit einer hohen Rate an Zellproliferation, Determinierungsvorgängen und Zelldifferenzierung. Diese Prozesse werden durch spezifische Signalmoleküle kontrolliert, welche in einem komplizierten Netzwerk zusammenwirken und sich gegenseitig beeinflussen. So entscheidet z.B. das Gegenspiel von Hes1, einem Zielgen der Notch-Signalkaskade, und dem Transkriptionsfaktor Hath1, ob die Determinierung intestinaler Vorläuferzellen in eine sekretorische oder absorptive Richtung verläuft. Die nachfolgende Spezialisierung der einzelnen Zelltypen benötigt weitere Faktoren, wie z.B. den Transkriptionsfaktor KLF4, der die Differenzierung der Becherzelle steuert. Auch die NFkB-Signalkaskade, die in der angeborenen Immunantwort eine zentrale Rolle spielt, ist dafür bekannt in die Regeneration des intestinalen Epithels einzugreifen. Eine Deregulierung solcher feinabgestimmter Signalnetzwerke kann die Funktion der intestinalen Barriere beeinträchtigen und zur Entstehung intestinaler Erkrankungen beitragen. So wurde bereits ein Zusammenhang zwischen Veränderungen in Expression von Hes1, Hath1 und KLF4 mit CED und Kolonkarzinomen beobachtet.

In dieser Arbeit untersuchte ich nun im Detail den Einfluss von Mikroorganismen auf die Differenzierung und Funktion des intestinalen Epithels. Dabei wurde eine bakterielle Regulation der Differenzierungsfaktoren Hes1, Hath1 und KLF4, sowie von Elementen der mukosalen Barriere, der Muzine Muc1 und Muc2 und der AMPs HBD2 und Elafin, untersucht. So konnte in einem *in vitro* Modell beobachtet werden, dass Hitze-inaktivierte intestinale Bakterien, insbesondere die *E. coli* Stämme *E. coli* K12 und *E. coli* Nissle 1917 (EcN) die Expression von Hes1 und Hath1 herunterregulieren. Gleichzeitig wurde eine Induktion von Muc1, HBD2 und Elafin beobachtet. Die Expression von KLF4 scheint zunächst durch Bakterien induziert, dann aber ebenfalls inhibiert zu werden. In einem *in vivo* Modell wurden des Weiteren keimfreie Mäuse mit den von spezifischen Pathogen-freien und konventionalisierten Mäusen verglichen. Dabei wirkte die Anwesenheit von Darmmikrobiota inhibitorisch auf die Expression von Hes1, Math1 (Maus-homolog zu Hath1) und KLF4. Im weiteren Verlauf konzentrierte sich meine Arbeit auf die Untersuchung der Effekte von EcN unter anderem aufgrund seiner therapeutischen Bedeutung. Durch *in vitro* Experimente mit verschiedenen EcN-Deletionsmutanten konnte mit dieser Arbeit gezeigt werden, dass Flagellin in die Regulation von Hes1, Hath1, Muc1, Elafin und HBD2 involviert ist. Zudem

wurde auch die Rolle der NFkB-Signalkaskade in der Expression von Hes1, Hath1, KLF4, Muc1, Muc2, HBD2 und Elafin untersucht. *In vitro* Versuche mit spezifischen NFkB-Blockern demonstrierten, dass NFkB in die EcN-bedingte Induktion von Muc1, Elafin und HBD2 eingreift. Die Expression von Hes1 und Hath1 konnte durch die NFkB-Blockade erheblich gehemmt und die Expression von KLF4 induziert werden. Um die Rolle der NFkB-Kaskade *in vivo* zu untersuchen, wurden Mäuse mit einer spezifisch in den intestinalen Epithelzellen vorliegenden NEMO-Deletion, die eine Stilllegung der kanonischen NFkB-Signalkaskade zur Folge hatte, eingesetzt. Diese NFkB-Defizienz führte im Kolon zu einer verminderten Expression von Hes1, Math1 und KLF4. Auch die Expression von Muc1 und tendenziell von Muc2 war im Dickdarm der NEMO knockout-Mäuse erniedrigt.

Die Ergebnisse dieser Arbeit verdeutlichen die Komplexität der Wechselwirkungen zwischen intestinalen Mikroorganismen und ihrem Wirt. Zum einen geben sie einen Hinweis darauf, dass Mikrobiota über die Regulation von Differenzierungsfaktoren wie Hes1, Hath1 und KLF4 an der intestinalen Differenzierung beteiligt sind, zum anderen wurde ein bakterieller Einfluss auf die Funktion der intestinalen Barriere, wie die Produktion von Muzinen und AMPs, bestätigt. Aus den hier präsentierten Ergebnissen kann auf einen Zusammenhang zwischen Mikroorganismen und der Entstehung intestinaler Erkrankungen wie CED und Kolonkarzinom über einen Einfluss auf die Faktoren Hes1, Hath1, KLF4 aber auch Muc1 geschlossen werden. Die genauen Zusammenhänge zwischen Mikrobiota, Zelldifferenzierung und Funktion des intestinalen Epithels könnten neue und therapierelevante Erkenntnisse für Erkrankungen wie CED liefern und sollten in weiteren Studien untersucht werden.

Teile dieser Arbeit wurden bereits veröffentlicht:

Becker S, Oelschlaeger TA, Wullaert A, Vlantis K, Pasparakis M, Wehkamp J, Stange EF, Gersemann M (2013) **Bacteria Regulate Intestinal Epithelial Cell Differentiation Factors Both *In Vitro* and *In Vivo***. PLoS ONE 8(5): DOI: 10.1371/journal.pone.0055620

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt dem Prof. Eduard F. Stange für die Überlassung des interessanten Themas und die Betreuung meiner Arbeit.

Prof. Jan Wehkamp danke ich für die Bereitstellung der Ressourcen, sowie für die Integration in seine Arbeitsgruppe und darauf folgenden wissenschaftlichen Austausch.

Dr. Michael Gerseemann danke ich für die intensive Zusammenarbeit, Hilfsbereitschaft und Unterstützung.

Prof. Matthias Schwab möchte ich für die Möglichkeit, meine Promotion am Dr. Margarete Fischer-Bosch - Institut für Klinische Pharmakologie durchzuführen, danken.

Besonderes möchte ich mich ebenfalls bei Dr. Maureen Ostaff für die hilfreichen Diskussionen, wissenschaftlichen Input, aber auch für die Motivation und ihre Freundschaft bedanken.

Auch bei Lioba Courth, Sabrina Stebe und Dr. Jana Precht möchte ich mich für die interessanten Diskussionen und für das Korrekturlesen meiner Dissertation bedanken.

Jutta Bader und Kathleen Siegel möchte ich für die kompetente technische Hilfestellung danken.

Ein großer Dank an alle Mitarbeiter der Arbeitsgruppe von Prof. Jan Wehkamp für die Zusammenarbeit und Unterstützung.